

**DNA-Microarrays zur Detektion  
von  
relevanten Antibiotikaresistenzen  
in  
*Bacillus anthracis* und *Yersinia pestis***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Markus Heinrich Antwerpen  
aus Bad Neuenahr- Ahrweiler

1. Referent: Professor Dr. W. Witte

2. Referent: Professor Dr. P. Dersch

eingereicht am: 14. 02. 2007

mündlichen Prüfung (Disputation) am: 06. 06. 2007

Druckjahr 2007

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht

### Publikationen:

**Nübel U., M. Antwerpen, B. Strommenger, W. Witte** (2005): DNA Microarrays for bacterial genotyping S. 287-313 in Stackebrandt E.: Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes, Springer-Verlag GmbH 2005

**Antwerpen M., M. Schellhase, E. Ehrentreich-Förster, F. Bier, W. Witte, U. Nübel.** (2006): DNA-Microarray for detection of antibiotic resistance determinants in *Bacillus anthracis* and closely related *Bacillus cereus*. Molecular and Cellular Probes, doi: 10.1016 / j.mcp. 2006.10.002

**Antwerpen M., A. Weller, W. Witte, U. Nübel.** (2007): DNA-Microarray for detection of antibiotic resistance determinants in *Yersinia* spp. relevant for antibiotic treatment of plague. Manuskript in Bearbeitung

**Ulrich Nübel, Birgit Strommenger, Kevin Kurt, Markus Antwerpen, Wolfgang Witte** (2007): DNA microarrays for bacterial species identification, subtyping, and resistance determination. in Schrenzel J.: COST action booklet. Manuskript in Bearbeitung.

### Tagungsbeiträge:

**Nübel, U., M. Antwerpen, E. Ehrentreich-Förster, E. Reiß, F. Bier, D. Naumann, W. Witte** (2005): Genotyping highly pathogenic bacteria with oligonucleotide microarrays. Poster auf dem Statusseminar Chiptechnologien der Dechema, Frankfurt, 03.-04.02.2005

**Antwerpen M., M. Schellhase, E. Ehrentreich-Förster, F. Bier, W. Witte, U. Nübel.** (2005): DNA-Microarrays for detection of relevant antibiotic resistance determinants in *Bacillus anthracis*. Poster KMP007 auf der gemeinsamen Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Medizin, Göttingen, 25.-28.09.2005. Biospektrum Sonderausgabe 2005: 81

**Antwerpen M., M. Schellhase, E. Ehrentreich-Förster, F. Bier, W. Witte, U. Nübel.** (2006): DNA-Microarray zur Detektion von Antibiotikaresistenzen in *Bacillus cereus* und *Bacillus anthracis*. Vortrag auf RKI-Doktorandentagung, Berlin, 01.07.2006

**Antwerpen M., M. Schellhase, E. Ehrentreich-Förster, F. Bier, W. Witte, U. Nübel.** (2006): Evaluation of a DNA-Microarray for Rapid Genotyping and Detection of relevant genetic antibiotic resistance determinants in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*. International Journal of Medical Microbiology Vol:296S3 p.64



χαίρετε νικῶμεν

Plutarch, *Ethika (Moralia)* 3, 347c



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Hintergrund . . . . .	1
1.2	Hochpathogene Bakterien . . . . .	2
1.2.1	B. anthracis . . . . .	3
1.2.2	Y. pestis . . . . .	4
1.2.3	Die nahen Verwandten . . . . .	6
1.3	Antibiotika und Resistenzen . . . . .	8
1.3.1	Überblick . . . . .	8
1.3.2	Vorkommen und Verbreitung von Resistenzgenen . . . . .	9
1.3.3	Mechanismen der Antibiotikaresistenzen . . . . .	9
1.3.4	Ciprofloxacin . . . . .	10
1.3.5	Doxycycline . . . . .	12
1.3.6	Rifampicin . . . . .	14
1.3.7	Vancomycin . . . . .	14
1.3.8	Streptomycin und Gentamicin . . . . .	16
1.4	Diagnostik in der klinisch-bakteriologischen Routine . . . . .	18
1.5	Mikroarrays . . . . .	19
1.5.1	Einführung . . . . .	19
1.5.2	Herstellung von Mikroarrays . . . . .	20
1.5.3	Markierung der zu untersuchenden DNA . . . . .	22
1.6	Microarrays in der Diagnostik . . . . .	22
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit . . . . .	24
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1	Material . . . . .	27
2.1.1	Geräte . . . . .	27
2.1.2	Chemikalien . . . . .	28
2.1.3	Enzyme und Reagenziensysteme . . . . .	29
2.1.4	Software und Datenbanken . . . . .	29
2.1.5	Puffer und Lösungen . . . . .	30
2.2	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide . . . . .	31
2.3	Anzucht der verwendeten Bakterien . . . . .	32
2.4	Selektion von Mutanten . . . . .	32
2.4.1	Selektion von Rifampicin-resistenten Mutanten . . . . .	32

2.4.2	Selektion von Ciprofloxacin-resistenten Mutanten . . . . .	33
2.5	Mikrobiologische Techniken . . . . .	35
2.5.1	MHK-Mikrobouilliontest . . . . .	35
2.5.2	Herstellung elektro-kompetenter Zellen . . . . .	35
2.5.3	Transformation mittels Elektroporation . . . . .	36
2.6	DNA-Präparation . . . . .	37
2.6.1	DNA-Extraktion . . . . .	37
2.7	DNA-Quantifizierung . . . . .	37
2.7.1	PicoGreen von Molecular Probes . . . . .	38
2.8	Amplifizierung der DNA durch PCR . . . . .	38
2.9	Überprüfung der Amplifikate . . . . .	40
2.9.1	Gelelektrophorese . . . . .	40
2.9.2	Sequenzierung . . . . .	40
2.9.3	Markierung mit Cy5dUTP . . . . .	41
2.9.4	Bestimmung der Einbaurate . . . . .	43
2.10	Microarrayherstellung . . . . .	44
2.10.1	Kopplung der Sonden an die Oberfläche . . . . .	44
2.10.2	Spotten der Microarrays . . . . .	44
2.10.3	Layout . . . . .	45
2.11	Hybridisierung auf dem Microarray . . . . .	47
2.11.1	Prähybridisierung . . . . .	47
2.11.2	Hybridisierung . . . . .	48
2.11.3	Waschen . . . . .	49
2.12	Auslesen . . . . .	50
2.13	Auswertung des Microarrays und Datenverwaltung . . . . .	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
3.1	Charakterisierung isolierter Mutanten . . . . .	55
3.1.1	Ciprofloxacin-resistente Mutanten . . . . .	55
3.1.2	Rifampicin-resistente Mutanten . . . . .	58
3.1.3	Streptomycin-resistente Mutanten . . . . .	61
3.1.4	Transformation von <i>Yersinia</i> . . . . .	61
3.2	Optimierung des Arbeitsprozesses . . . . .	63
3.2.1	Multiplex-PCR . . . . .	63
3.2.2	Markierungsreaktion . . . . .	67
3.3	Entwicklung des Microarrays „BaRes“ . . . . .	69
3.3.1	Detektionsfähigkeit des Arrays . . . . .	72
3.4	Hybridisierungsergebnisse - BaRes . . . . .	72
3.4.1	Allgemein . . . . .	72
3.4.2	Hybridisierungskinetik . . . . .	76
3.4.3	Reproduzierbarkeit . . . . .	82
3.5	Entwicklung des Microarrays „YpRes“ . . . . .	85
3.5.1	Detektionspotential - „YpRes“ . . . . .	87
3.6	Hybridisierungsergebnisse - „YpRes“ . . . . .	88

3.6.1	Allgemein . . . . .	88
3.6.2	Reproduzierbarkeit . . . . .	91
3.6.3	Blind-Studie . . . . .	91
3.7	Datenbank . . . . .	94
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
4.1	Resistenzprüfung . . . . .	97
4.1.1	Phänotypische Resistenztests . . . . .	97
4.1.2	Genotypische Resistenztests . . . . .	98
4.1.3	Einführung des Systems . . . . .	99
4.2	Sonden – Design und Leistung . . . . .	100
4.2.1	Sequenz-Analyse und Auswahl von Resistenzgenen . . . . .	100
4.2.2	Ergebnis des Sondendesigns . . . . .	103
4.2.3	Einbringen künstlicher Mutationen . . . . .	103
4.3	Microarray - Reproduzierbarkeit, Kinetik, Blind-Studie . . . . .	104
4.3.1	Differenzierungsfähigkeit . . . . .	104
4.3.2	Kinetik . . . . .	105
4.3.3	Reproduzierbarkeit . . . . .	106
4.3.4	Blind-Studie mit „Ypres“ und <i>Y. enterocolitica</i> . . . . .	108
4.4	Mutationen und Mutanten . . . . .	111
4.4.1	Bacillus . . . . .	111
4.4.2	Yersinia . . . . .	114
4.5	Datenbank . . . . .	116
4.6	Fazit und Ausblick . . . . .	116
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>119</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>141</b>
A.1	Primer . . . . .	141
A.2	Sonden . . . . .	143
A.3	Spottinglayout „Bares“ . . . . .	145
A.4	Spottinglayout „YpRes“ . . . . .	146
A.5	Ergebnisse Blind-Studie . . . . .	147
<b>B</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>149</b>
<b>C</b>	<b>Danksagung</b>	<b>153</b>
<b>D</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>155</b>



# 1 Einleitung

*Speed is the essence when one deals with bacterial infections.*

Bergeron *et al.*, 1998, J Clin Microbiol 36: 2169-2172

## 1.1 Hintergrund

In einem Minireview, welches sich mit der Identifikation von Antibiotikaresistenzen auseinandersetzt, lässt sich der oben zitierte Satz finden [13]. Seine Aussage lässt sich sicherlich unterstützen. Gerade bei langsam wachsenden und schwerkultivierbaren Bakterien, aber auch bei solchen die einen raschen foudroyanten Krankheitsverlauf bewirken, müssen schnelle Alternativen zur phänotypischen Resistenztestung gefunden und entwickelt werden.

Laut einer Definition von Spencer und Wilcox (1993) [139] sind Agenzien der Biologischen Kriegsführung „...*living organisms, whatever their nature, or infected material derived from them, which are used for hostile purposes and intended to cause disease or death in man, animals and plants, and which depend for their efforts on the ability to multiply in the person, animal, or plant attacked.*“ Ein multiresistenter hochpathogener Organismus, sei er künstlich gezüchtet oder nicht, weist sicherlich oben genannte Eigenschaften auf. Schnelles Handeln ist im Falle einer Infektion mit einem solchen Erreger mehr als nur sinnvoll - es ist essentiell.

## 1.2 Hochpathogene Bakterien

Das Bundesministerium für Gesundheit in Zusammenarbeit mit der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit veröffentlicht eine Liste von Organismen, in der verschiedene Bakterien, Viren und Parasiten den sog. Risikogruppen 1 bis 4 nach den allgemeinen Kriterien gemäß § 5 Abs. 1 Satz 1 und Abs. 2 Satz 1 der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV)[121] zugeordnet werden. Ausschlaggebend für die Klassifizierung ist dabei das Gefährdungspotential, das von den einzelnen Organismen ausgeht. Es wird bewertet nach Ansteckungsart, möglicher Schwere der auftretbaren Infektion und Behandlungsmöglichkeiten.

Der höchsten Risikogruppe - Risikogruppe 4 - werden nur die Viren zugeordnet, die ein sehr hohes Risiko für den Menschen darstellen. Zu den der Risikogruppe 3 zugeordneten Bakterien zählen unter anderen *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis* und *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. Diese sind somit als hochpathogen einzustufen und besitzen für den Menschen ein mäßiges bis hohes Gefährdungspotential [121].

Leider treten sie noch in einer weiteren Aufzählung in Erscheinung. Dabei handelt es sich um eine Klassifizierung der für Bioterrorismus geeigneten Agenzien, die das Center of Disease Control and Prevention (CDC) [29] veröffentlicht hat. Dort werden diese drei Mikroorganismen zusammen mit dem Giftstoff von *Clostridium botulinum*, *Variola major* und den hämorrhagischen Fiebertsviren, wie z.B. dem Ebola- oder auch dem Lassavirus als Agenz einer Klasse A-Waffe eingestuft. Zur Klasse A zählen solche Waffen, die das größte Potential für nachteilige Auswirkung des öffentlichen Gesundheitswesens bei einem Massenunfall haben und eine breitgefächerte Vorbereitung des öffentlichen Gesundheitswesens, wie z.B. verbesserte Überwachung- und Labordiagnose und Speichern der spezifischen Medikationen erfordern [29]. Agenzien der Klasse A haben zusätzlich die Eigenschaft, dass diese ein mäßiges bis hohes Potential für eine großräumige Verbreitung besitzen und in der Öffentlichkeit erhöhte Aufmerksamkeit erfahren, die im Falle eines Ausbruchs zu einer allgemeinen Massenfurcht und Zusammenbruch des zivilen Lebens führen kann. Arbeiten mit solchen Organismen dürfen nur unter hohen Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt werden, welche unbequem und kostspielig sind. Zwar ist man bei Beachtung dieser vor einer Infektion geschützt, doch ein Restrisiko kann nie ausgeschlossen werden.

Aus diesen Gründen versucht man in der Regel bei der Entwicklung einer Detektionsmethode anfangs möglichst nur mit Nukleinsäuren oder genetisch sehr nahe



verwandten Organismen zu arbeiten, welche nicht als hochpathogen eingestuft werden. Zwar gibt es auch avirulente *B. anthracis*-Stämme, doch gelten für sie ebenfalls die hohen Sicherheitsbestimmungen [121]. In unserem Fall haben wir uns auf die ersten zwei Organismen *Y. pestis* und *B. anthracis* focussiert und zwei genetisch nahe verwandte und harmlosere *Bacillus*- bzw. *Yersinia*-Arten gewählt, mit denen wir ein Detektionssystem entwickeln.

### 1.2.1 B. anthracis

*Bacillus anthracis* wurde erstmals von P. Fr. Rayer 1850 aus Schafblut isoliert [122, 34]. Die Name des Milzbranderreger stammt vom verursachten Krankheitsbild des Erregers - „kohle“-artige (gr. anthracis) Läsionen auf der Haut.

Robert Koch gelang es 1876 mit Hilfe dieses Krankheitserregers zum ersten Mal die nach ihm benannten „Kochschen Postulate“ zu erfüllen, indem er den Erreger auf Versuchstiere übertragen und aus ihnen erneut isolieren konnte. Fünf Jahre später konnte Louis Pasteur Versuchstiere mit attenuierten Stämmen immunisieren und einen Impfstoff gegen Milzbrand herzustellen [122, 34, 26].

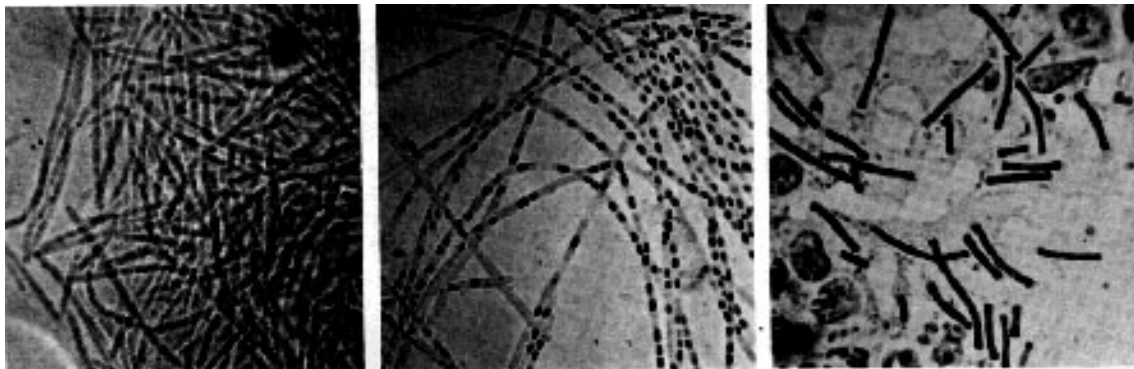


Abb. 1.1: Bilder der Original Fotos von Robert Koch von *B. anthracis* ([www.pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/koch.jpg](http://www.pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/koch.jpg))

Bei *B. anthracis* handelt es sich um ein aerobes, gram-positives, nicht-bewegliches, sporenbildendes Stäbchen (Abb 1.1). Es ist  $1-1,5\mu\text{m}$  breit und  $3-10\mu\text{m}$  lang [94, 60]. Die Sporen treten in zentraler oder subzentraler Position auf und sind sehr resistent gegen verschiedenste Umwelteinflüsse wie Hitze, Kälte, Austrocknung, chemische Behandlung oder ultraviolette Strahlung [94, 122]. Ein virulentes Isolat von *B. anthracis* besitzt die 2 Virulenzplasmide pXO1 und pXO2. Ersteres ist der Träger der Gene für die Toxine, wie den Ödem-Faktor (*cya*), das Lethal-Toxin (*lef*) sowie ein schützendes Antigen (*pagA*). Es ist ähnlich organisiert wie eine chromosomal

codierte Pathogenitätsinsel. Das Plasmid pXO2 trägt unter anderem drei Gene für die Kapselsynthese, die es der vegetativen Zelle ermöglicht, die Phagocytose des Wirtsorganismus zu inhibieren. [122, 118, 120]

Drei verschiedene Krankheitsbilder sind je nach Infektionsweg möglich: Hautanthrax, Lungenanthrax oder gastrointestinaler Anthrax. Die beiden letzteren Formen sind die gefährlichsten, aber auch die seltensten [70, 22, 135].

Die Sporen von *B. anthracis* gelangen in der Regel durch offene Wunden, Nahrungsaufnahme oder Inhalation in den Körper. Am häufigsten ist das Eindringen durch Wunden, in denen die Sporen keimen können. Das Bakterium vermehrt sich dort schnell und produziert Toxinsekrete, die die typischen schwarzen Läsionen verbunden mit Ödemen sowie Nekrose verursachen. Bei tieferem Eindringen des Bakteriums in die Wunde kann das Bakterium dann eine systemische Infektion hervorrufen. In diesem Fall kann sich das Bakterium weiter vermehren und produziert dabei so große Mengen an Toxin, dass Schock, Ausfall der Atmung und Tod die Folge sein können.

Gelangen die Sporen über die Nahrung oder den respiratorischen Trakt in den Körper, so werden sie in der Regel von den Makrophagen aufgenommen, keimen in den Lymphknoten und verursachen von dort ausgehend eine systemische Infektion mit meist tödlichem Ausgang. [70, 135, 164]

Zur Behandlung von infizierten oder mit *B. anthracis* exponierten Personen wird zu Ciprofloxacin, Rifampicin, Doxycyclin oder Vancomycin geraten [29, 8, 18, 23].

### 1.2.2 *Y. pestis*

*Yersinia pestis*, der Erreger der Pest, ist ein gram-negativer, bekapselter und unbegeißelter Vertreter der *Enterobacteriaceae* [94, 60]. Während die Differenzierung gerade zu dem nahe verwandten *Yersinia pseudotuberculosis* sehr schwer ist, ist der Unterschied im Krankheitsbild ungleich größer [2, 112, 148].

Die verschiedenen *Y. pestis*-Stämme lassen sich phänotypisch in Biovare aufteilen, welche sich auf geographische und physiologische Merkmale hin definieren. Glycolfermentation, Nitratreduktion, Rhamnose- und Melibiosefermentation sowie Arabinosefermentation zählen zu den physiologischen Unterscheidungskriterien dieser Biovare. Phylogenetisch ist diese Unterteilung jedoch nicht sinnvoll, da gezeigt werden konnte, dass beispielsweise die zur Nitratreduktion befähigten Stämme keinen monophyletischen Ursprung besitzen [1]. Mittels Genomvergleiche konnte man dagegen feststellen, dass *Y. pestis*-Stämme in acht Populationen aufgeteilt werden

können, die alle evolutionsbedingt auf *Y. pseudotuberculosis* zurückgeführt werden können. Zusätzlich konnte durch Microarrayanalysen gezeigt werden, dass das Chromosom von *Y. pseudotuberculosis* sich von *Y. pestis* CO92 hauptsächlich durch das Fehlen von drei genomischen Inseln unterscheidet, die allesamt Prophagen codieren. Solche Prophagen können Virulenzfaktoren codieren, die aus einem nicht-virulenten Stamm einen solchen mit einer hohen bzw. erhöhten Virulenz generieren [170] könnten.

In der pathologischen Wirkung unterscheiden sich die Biovare oder Populationen nicht. Ein voll virulenter *Y. pestis*-Stamm trägt neben einer „High-Pathogenicity-Island“ [27] mindestens drei spezifische Plasmide. Zwei Plasmide davon wurden bis jetzt nur in *Y. pestis*-Stämmen beobachtet. Dabei handelt es sich zum einen um das Plasminogenplasmid pPst, das auch das Bacteriozid Pestizin codiert. Dieses ist das kleinste *pestis*-spezifische Plasmid und codiert neben dem Aktivator des Plasminogens und dem Bacteriozid auch das auf das Pesticin abgestimmte Immunitätsprotein [33].

Das zweite *pestis*-spezifische Plasmid heißt pMT1 und ist das Toxin- und Kapselcodierende Plasmid. Gerade das Kapselprotein ist von besonderer Bedeutung, da es einen passiven Abwehrmechanismus gegenüber dem Immunsystem des Wirtsorganismus darstellt. Das auf dem Plasmiden pMT1 ebenfalls codierte Mureintoxin scheint besonders bei Mäusen und Ratten effektiv zu wirken, die den Hauptwirtorganismus für *Yersinia pestis* darstellen [76].

Zusätzlich zu diesen zwei Plasmiden ist jedoch für die Virulenz das Plasmid pCD1 von größter Bedeutung, welches in allen humanpathogenen Yersinien zu finden ist. Es codiert ein Typ III-Sekretionssystem, welches es ermöglicht die ebenfalls auf dem Plasmid codierten Effektorproteine in die Wirtszelle zu injizieren. Deren Wirkung reicht von Inhibierung der Phagocytierung über Induktion der Apoptose bis hin zu noch unbekannten Funktionen, die ebenfalls eine erhöhte Virulenz des Bakteriums verursachen [40, 39].

Zusätzlich weist speziell *Y. pestis* Pseudogene auf, die bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* noch funktionsfähig vorliegen [33, 40].

Sind alle virulenzabhängigen Gene in einem Stamm vorhanden, präsentiert sich eine Infektion mit *Yersinia pestis* in unterschiedlichen Krankheitsbildern.

Zunächst bilden wildlebende Nagetiere für diese Zoonose das natürliche Erregerreservoir, auf den Menschen wird die Krankheit durch Stiche oder Bisse infizierter Mücken und Flöhe übertragen [135, 116]. Ist der Wirtswechsel auf den Menschen

vollzogen, kann sekundär durch Tröpfcheninfektion der Erreger wiederum auf andere Menschen übertragen werden. Diese erkranken dann an primärer hochinfektiöser Lungenpest, die in den meisten Fällen letal verläuft. Am häufigsten ist jedoch die Bubonenpest als Primärinfektion durch infizierte Tiere anzutreffen. Sie zeigt sich durch Anschwellen der Lymphknoten, starken Schüttelfrost, Fieber und Diarrhoe. Im fortgeschrittenen Zustand, der septischen Pest, kommen Organversagen, Kreislaufkollaps, Haemorrhagie sowie Nekrose der Extremitäten hinzu [70, 22].

Bei Infektionen mit *Yersinia pestis* wird in der Regel zu Antibiotika wie Ciprofloxacin, Doxycyclin, Streptomycin und Gentamicin gegriffen [29, 8, 19]. Leider wurde bereits im Jahre 1995 aus einem Jungen in Madagaskar ein Isolat gewonnen, das einen Multiresistenzplasmiden trug, welches Resistenzgene gegen Chloramphenicol, Tetracycline, Streptomycin, Spectinomycin, Gentamicin, Sulfonamide, Cephalosporine und Trimethoprim aufwies [67, 59]. Durch das Auftreten dieses Isolats reagierte die WHO und rief zu erweiterter Aufmerksamkeit hinsichtlich neuer Multiresistenzen und zur Warnung vor Überinterpretation der Ergebnisse auf [48]. Es sei keineswegs sicher, dass dieser Stamm eine neue Pandemie hervorrufen könne [48].

### 1.2.3 Die nahen Verwandten

Aus politischen und ethischen Gründen wurde bewusst beschlossen, nicht in hochpathogenen Bakterien Mutationen zu erzeugen und Mutanten zu selektieren. Auch das bewusste Einbringen von Resistenzgenen in das Genom dieser Bakterien sollte für diese Arbeit nicht durchgeführt werden.

Daher entschieden wir uns für die Verwendung ebenfalls komplett sequenzierter und sehr naher Verwandter von *B. anthracis* und *Yersinia pestis*.

*B. anthracis* zählt phylogenetisch zur der *Bacillus cereus*-Gruppe. Diese Gruppe gilt als sehr homogen. Genomvergleiche der Spezies dieser Gruppe zeigen, dass es sich bei diesen Spezies eigentlich um Varianten einer Spezies handelt, welche sich nur durch Unterschiede hinsichtlich der Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen unterscheiden [74, 73, 117]. Eine Speziesunterscheidung nur aufgrund von physiologischen Tests wird aufgrund immer neuer Umweltisolate schwieriger und lässt eine eindeutige Zuordnung nicht immer möglich erscheinen [87, 86]. Dadurch kann man nicht mehr generell von der Spezies auf ein mögliches Gefährdungspotential schließen, wie das Auftreten von *B. cereus* G9241, *B. cereus* Zebra Killer oder *B. thuringiensis* 97-27 zeigt [117]. Bei der Abschätzung des Gefährdungspotentials gewinnen die codierten Sequenzen der vorhandenen Plasmide immer größere

Bedeutung. So besitzen die meisten virulenten Stämme einen Plasmiden, der dem Plasmiden pXO1 gerade im Bereich der Replikation sehr ähnelt. Anstelle der dort codierten Pathogenitätsinsel besitzen die geringer virulenten Stämme jedoch andere Strukturgene [119].

Somit gewinnt die Genotypisierung immer mehr an Bedeutung und ist zudem erforderlich um schnell die Präsenz möglicher Virulenzfaktoren festzustellen [86].

Bei *B. cereus* ATCC14579 handelt es sich um einen allgemein akzeptierten avirulenten Typstamm. Vogler *et al.* [154] arbeiteten mit ihm und erzeugten mit ihm im Vergleich mit *B. anthracis* Sterne Rifampicin-resistente Mutanten. Rasko *et al.* veröffentlichten 2004 [118] das Genom von *B. cereus* ATCC10987, welches aufgrund durchgeführter Vergleiche eine deutlich höhere Ähnlichkeit zu *B. anthracis* aufweist als der Typstamm ATCC14579. Auch wenn *B. cereus* ATCC10987 metabolische Anpassungen und ein verwandtes Plasmid zu pXO1 von *B. anthracis* besitzt, verursacht er kein Anthrax [118, 119] und wird wie ein L2-Organismus behandelt. Durch die enge Verwandtschaft, seine verminderte Virulenz und der Tatsache, dass er in den für diese Arbeit wichtigen Genomabschnitten eine fast identische Sequenz mit *B. anthracis*-Sequenzen aufweist, eignet sich *B. cereus* ATCC10987 besonders in dieser Arbeit als realitätsnaher Modellorganismus zur Entwicklung einer Diagnostik verwendet zu werden.

Ähnliche Argumente liegen bei der Wahl des *Yersinia pestis*-Verwandten vor. Bei der Auswahl des verwendeten Stammes entschieden wir uns hier für den avirulenten Typstamm *Yersinia pseudotuberculosis* DSM8992. Dieser ist in den relevanten Genabschnitten sequenz-identisch zu *Yersinia pestis*, besitzt kein Virulenzplasmid und zeigt auch nicht das starke Krankheitsbild von *Yersinia pestis*. Aufgrund seiner im letzten Abschnitt beschriebenen genotypisch sehr engen Verwandtschaft zu *Y. pestis* und seiner verminderten Virulenz wurde sich dafür entschieden mit *Y. pseudotuberculosis* als Modellorganismus eine Diagnostik zu entwickeln, die eigentlich auf den Organismus *Y. pestis* ausgerichtet ist.

Des Weiteren sind die beiden Organismen *B. cereus* und *Y. pseudotuberculosis* in die Sicherheitsstufe 2 eingeteilt worden und somit kann unter L2-Bedingungen bearbeitet werden, was neben einer deutlich vereinfachten Handhabung auch Kostenersparnisse mit sich bringt.

## 1.3 Antibiotika und Resistenzen

### 1.3.1 Überblick

Infektionen mit hochpathogenen Bakterien werden weltweit glücklicherweise geringer, auch wenn sie immer noch auftreten ([www.promedmail.org](http://www.promedmail.org)). Erfahrungen mit solchen Infektionen beruhen daher auf klinischen Fällen der 40er und 50er Jahre des letzten Jahrhunderts. Dies ist auch zu erkennen, wenn man die Behandlungsempfehlungen betrachtet. Dort werden in erster Linie nur ältere Antibiotikaklassen empfohlen. Dies ist nicht verwunderlich, da erst nach den Postsendungen in den Vereinigten Staaten von Amerika im Jahre 2001 klinische Erfahrungen mit neueren Antibiotika wie Quinolonen gemacht wurden und auch nur wenige klinische Studien mit neueren Cephalosporinen bekannt sind. In älterer Literatur wird beispielsweise noch zum Einsatz von Benzylpenicillin geraten. Später wurde gezeigt, dass bei *B. anthracis* eine natürlich reprimierte  $\beta$ -Laktamase im Genom vorliegt, welche mit der Zeit konstitutiv expremiert werden kann [114]. Dieses Antibiotikum wird daher in neuerer Literatur zur Prophylaxe oder Behandlungen von Infektionen mit *B. anthracis* nur noch selten genannt.

Mehrere unterschiedliche Strategien werden in der heutigen Zeit angewendet, um neuartige antibakterielle Stoffe zu finden. Zum einen werden potentielle Kandidaten untersucht, indem unterschiedliche Bakterien- und Pilz-Spezies bezüglich ihrer antimikrobiellen Aktivität charakterisiert werden. Zum anderen werden aber auch bereits existierende Antibiotika durch Derivatisierung verändert und somit neue halb- oder voll-synthetische Antibiotika entdeckt.

In der Regel agieren Antibiotika auf fünf verschiedene Arten und Weisen [71]:

1. Inhibierung der DNA-Synthese (z.B. Rifampicin, Chinolone)
2. Inhibierung der Proteinsynthese (z.B. Tetracyclin, Chloramphenicol)
3. Interagierung mit der Zellmembran (z.B. Polymyxine)
4. Eingriff in Enzymsysteme (z.B. Sulphomethoxazole)
5. Interaktion mit der Zellwand (z.B. Penicillin, Vancomycin)

### 1.3.2 Vorkommen und Verbreitung von Resistenzgenen

Viele Infektionskrankheiten konnten bereits durch Antibiotika vermeintlich unter Kontrolle gebracht werden, doch nimmt die Anzahl resistenter bakterieller Infektionserreger zu. Das Auftreten einer Resistenz scheint unvermeidlich der Einführung eines Antibiotikums zu folgen. Zur Verbreitung solcher Resistenzen haben Bakterien mehrere Mechanismen entwickelt, welche entweder auf Modifizierung von existierendem genetischem Material beruhen, oder aber auf Erwerb von zusätzlichen Genen [94, 70].

Dabei gilt ein besonderes Augenmerk vor allem den im Erdreich vorkommenden Actinomyceten, welche zu den Antibiotikaproduzenten zählen. Sie produzieren nicht nur die unterschiedlichsten Arten von Antibiotika, sondern verfügen zum Selbstschutz auch über Resistenzgene. Es wird vermutet, dass aminoglycosid-modifizierende Kinasen und Enzyme zur Veränderungen der Mureinsynthese, die häufig bei Vancocycin-Resistenz exprimiert werden, ursprünglich aus solchen Organismen stammen [43, 44, 45]. Resistenzgene dieser Art sind in der Regel auf mobilen genetischen Elementen in unterschiedlichsten Variationen organisiert und können somit auch durch molekularbiologische Techniken in andere Organismen gewollt eingebracht werden. Ein solches Einbringen von mobilen Elementen wie Integrons, Transposi oder Plasmiden kann via Transformation (z.B. bei *Streptococcus* spec.), Transduktion (z.B. bei *Staphylococcus* spec.) oder Konjugation wie zum Beispiel bei *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spec. oder *Enterococcus* spec. erfolgen.

Die Verbreitung der Resistenzen durch den sogenannten „horizontalen Gentransfer“ steht dem „vertikalen Gentransfer“ gegenüber, bei dem spontan auftretende Resistenzvermittelnde Mutationen des Genoms an die Nachkommen übertragen werden und sich so in der Population etablieren können. Durch geeignete Methoden ist es möglich, solche Mutationen hervorzurufen und resistente Organismen zu selektieren.

### 1.3.3 Mechanismen der Antibiotikaresistenzen

Im Laufe der Evolution entwickelten sich verschiedene Mechanismen in Bakterien und statteten sie so mit Antibiotikaresistenzen aus. Diese Mechanismen können entweder das Antibiotikum abbauen oder wirkungslos machen, indem das Antibiotikum entweder aus der Zelle exportiert wird oder aber durch Modifizierung der Zielmoleküle. Häufig anzutreffen ist auch die enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums.

Dabei ist ein Enzym vorhanden, welches das Antibiotikum chemisch so verändert, dass es unwirksam wird. Tabelle 1.1 und Abbildung 1.2 zeigen eine Übersicht über die verschiedenen Resistenzmechanismen und Auftreten bei den Antibiotika [71].

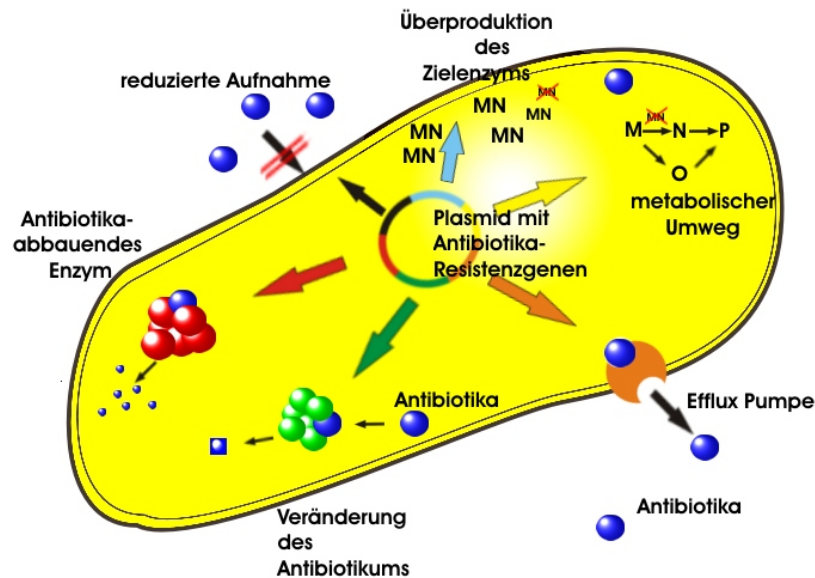


Abb. 1.2: Übersicht über verschiedene Resistenzstrategien gegen Antibiotika.

In den folgenden Abschnitten sollen die für diese Arbeit relevanten Antibiotika, deren Wirkungsweise und die mit dem Antibiotikum assoziierten und aufgetretenen Resistenzen kurz dargestellt werden.

### 1.3.4 Ciprofloxacin

Das Fluorochinolon Ciprofloxacin zählt zur Gruppe II der Fluorochinolone mit einer höheren Aktivität gegen gram-negative Bakterien als Zugehörige der Gruppe I. Als Derivat der Nalidixinsäure interagiert es mit den Typ II Topoisomerasen. Diese sind die DNA-Gyrase und die DNA-Topoisomerase IV. Beide bestehen aus jeweils 4 Untereinheiten. Erstere setzt sich aus den Untereinheiten GyrA<sub>2</sub>GyrB<sub>2</sub> zusammen, letztere aus ParC<sub>2</sub>ParE<sub>2</sub> [78].

Die Aufgabe der Topoisomerasen besteht in der Kontrolle der DNA-Topologie bei der DNA-Replikation, -Rekombination und -Transkription, indem sie den Spiralierungsgrad der DNA beeinflussen. Um dies zu bewirken, binden die Enzyme zunächst die DNA und führen dann an dieser Doppelstrangbrüche durch. Anschließend wird die DNA um ihre Achse gedreht und an den Brüchen wieder miteinander verbunden. Der mögliche Interaktionsmechanismus des Chinolons liegt nun darin, dass nach



Tab. 1.1: Übersicht zu Resistenzmechanismen. DHPS: Dihydropteroat-Synthase; DHFR: Dihydrofolat-Reduktase

Nr.	Resistenzmechanismus	Antibiotikaklasse	Wirkungsweise
1	Mutation (AS-Austausch) zur Modifikation des Targets	Fluorochinolone	AS-Austausch in DNA-Topoisomerase IV und der DNA-Gyrase
		Rifampicin	AS-Austausch in Untereinheit B der ribosomalen Polymerase
		Streptomycin	AS-Austausch in Ribosom
		Sulfonamide	AS-Austausch in DHPS
		Trimethoprim	AS-Austausch in DHFR
2	Modifikation des Targets	Makrolide	Acetylierung der 23SrRNA
		Linkosamine	
		Glykopeptide	Bildung eines Peptidgerüsts (D-Laktat-D-Alanin) anstelle des D-Ala-D-Ala der N-Acetylmuraminsäure
3	Synthese eines unempfindlichen Targets	$\beta$ -lactam Antibiotikum	
4	Enzymatische Modifizierung	Chloramphenicol	Acetyltransferase
		$\beta$ -lactam Antibiotikum	$\beta$ -Lactamasen
		Aminoglycoside	Acetylierung
			Phosphorylierung
			Adenylierung
			Actelytransferasen
5	Efflux	Streptogramine	ABC-Transporter
		Fluorochinolone (gram-neg)	
		Makrolide	
		Streptogramine	
		Tetracycline	
		Tetracycline	
6	Protektion des Targets	Chinolone	Protonenpumpen
			spezifische Proteine zum Schutz der Ribosome
			spezifische Proteine zum Schutz der Gyrase
7	Überproduktion des Targets	Sulfonamide	
		Trimethoprim	
8	Metabolischer Umweg der inhibierten Reaktion	Sulfonamide	
		Trimethoprim	

Durchführung des Doppelstrangbruchs der gebundenen DNA durch das Enzym das Chinolon mit dem 3'-Ende der geschnittenen DNA interkaliert und somit eine Ligation der geschnittenen DNA unterbindet. Damit würde der intermediäre Zustand des DNA-Enzymkomplexes stabilisiert werden und das Enzym wäre wirkungslos. Durch diese Fähigkeit wirkt es gegen gram-positive als auch gegen gram-negative Bakterien. So wird es nicht nur bei Infektionen mit *B. anthracis* empfohlen, sondern auch zur Behandlung von Infektionen mit *Yersinia pestis* [8, 29].

Resistenzen gegen Ciprofloxacin, die bei *B. anthracis* insbesondere von Price *et al.* [115] untersucht wurden, treten sowohl bei gram-negativen als auch bei gram-positiven Bakterien in „hot spots“ oder QRDRs (Quinolone Resistenz Determining Regions) auf [78]. Es handelt sich dabei um Punktmutationen in den codierenden Genen der Untereinheiten, welche eine Konformationsänderung im Protein zu Folge haben. Bei *Yersinia* und auch *Bacillus* sind die jeweils zuerst auftretenden Mutationen bei Isolierung von resistenten Mutanten auf Nährböden mit aufsteigenden Konzentrationen jeweils im *gyrA*-Gen zu finden [78, 115, 91, 11, 79]. Mutationen in diesem Gen scheinen weitere zusätzliche Mutationen, deren Auftreten ein höheres Resistenzniveau hinsichtlich der Mindesthemmkonzentration bewirkt, zu bedingen. Mutationen in den Genen der Topoisomerase IV allein hatten keine Auswirkungen auf den Phänotyp [78].

Für *B. anthracis* und *B. cereus* wurden in *gyrA* drei Nukleotid-Positionen, für *gyrB* 2 und für *parC* ebenfalls zwei Positionen mit Resistenz-vermittelnden Nukleotid-Austauschen beobachtet [115]. Bei *Yersinia spec.* sind es acht Positionen in *gyrA* [79].

Zusätzlich zu den Punktmutationen wirkt sich auch das Vorhandensein von bestimmten Efflux-Systemen sowie eines Quinolone-Resistance (Qnr)-Proteins als resistenzunterstützend auf die Organismen aus. Die Efflux-Systeme spielen erst bei hochresistenten Organismen eine Rolle [115, 11] und das beschriebene Qnr-Enzym [162, 161, 160] wurde bisher weder bei *Yersinia* noch bei *Bacillus* beobachtet.

### 1.3.5 Doxycycline

Doxycyclin gehört zur Wirkstoffgruppe der Tetracycline, die nach ihrem Naphthacen-Ring benannt wurden [94]. Als erstes der sogenannten „Breitband-Antibiotika“ inhibiert es fast alle gram-positiven und gram-negativen Bakterien und wird insbesondere gegen Erreger eingesetzt, die intrazellulär gelagert sind [38]. Aus diesem Grund wird es auch zur Behandlung von Infektionen mit *Yersinia pestis* und *B. anthracis*

empfohlen [8, 29].

Tetracycline, die aus *Streptomyces*-Arten gewonnen werden, greifen bei den Bakterien in die Proteinsynthese ein, indem sie die Funktion der Ribosome der Bakterienzelle stören [124, 125, 38]. Dabei blockieren sie das Binden ankommender Aminoacyl-tRNAs an deren Bindestelle an der 30S-Untereinheit des Ribosoms und unterbinden somit eine weitere Elongation der bereits translatierten Aminosäurekette.

Für Tetracycline sind verschiedene Resistenzmechanismen beschrieben worden [124, 125, 38]:

- Efflux (*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(K)*, *tet(L)*, ...)
- Schutz des Ribosoms (*tet(M)*, *tet(O)*, ...)
- Enzymatischer Abbau (*tet(X)*, *tet(34)*, *tet(37)*)

Gemein haben diese Resistenzmechanismen, dass das Vorhandensein von speziellen *tet*-Genen zwingend notwendig ist, um sie ausbilden zu können. Für *Bacillus*-Arten scheinen nur *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(L)* und *tet(K)* von Bedeutung, da alle anderen beschriebenen bis jetzt entweder noch nicht in gram-positiven Bakterien oder zumindest nicht naheverwandten Arten beschrieben wurden [4, 66, 6]. Beobachtet und in der Datenbank des NCBI erfasst wurden bis jetzt zum Beispiel *Bacillus* sp. (AF491293) mit *tet(L)* auf einem *Tn916*-like Transposon und plasmidisch kodiert bei *B. stearothermophilus* auf dem Plamiden pTB19 (M63891) und bei *B. cereus* auf dem Plamiden pBC16 (X51366).

Bei gram-negativen Bakterien wie *Yersinia pestis* oder *Francisella tularensis* wird die Resistenz nicht durch eben aufgezählte Gene hervorgerufen, sondern insbesondere durch die Gene, die spezifische Effluxpumpen codieren. *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)* sind hier besonders beobachtet worden. *tet(B)* [37], *tet(C)* [51] und *tet(D)* [59] wurden bereits in der Gattung *Yersinia* bzw. in *Yersinia pestis* speziell beschrieben, *tet(C)* in *Francisella tularensis* (AF055345). Die Nomenklatur dieser Gene ist im Laufe der Zeit nicht streng berücksichtigt worden, sodass an dieser Stelle darauf hingewiesen werden muss, dass die bei dieser Arbeit verwendeten Genbezeichnungen mit denen von Levy *et al.* [89] gleichzusetzen sind.

### 1.3.6 Rifampicin

Ein Antibiotikum, das in den Prozess der Transkription eingreift, ist Rifampicin (RIF). Eigentlich als Tuberkulostatikum der ersten Wahl gedacht, ist das bakterizid wirkende Antibiotikum sehr effektiv gegen eine Vielzahl von Bakterien und wird somit zu den Breitbandantibiotika gezählt. Es wird ebenfalls zur Behandlung von Infektionen mit *B. anthracis* empfohlen.

Zusammen mit Erythromycin, Mitomycin und anderen gehört es aufgrund seiner Struktur zu den Macrocyclischen Lactonen. Das halbsynthetische Produkt - dessen Ausgangssubstanz aus *Streptomyces mediteraneum* gewonnen wird - tötet Bakterien ab, indem es an die RNA-Polymerase bindet und die Elongation des RNA-Transkriptes verhindert. Dabei bindet es an einer allosterischen Bindestelle der  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase und nicht in dessen aktivem Zentrum [31]. Ist Rifampicin gebunden, ist eine abschließende Transkription nicht mehr möglich und der Kata- und Anabolismus des Bakteriums kann nicht aufrechterhalten werden [94].

Resistenzen gegen Rifampicin basieren auf Punktmutationen, die im Gen *rpoB* auftreten. Die vorkommenden Mutationen rufen eine Aminosäuresequenz-Änderung in der  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase hervor und lassen sich auf DNA-Ebene alle in einem räumlich begrenzten Sequenzabschnitt erfassen. Rifampicin-Resistenz verursachende Mutationen in *Bacillus cereus* und *Bacillus anthracis* wurden ausführlich von Vogler *et al.* [154] untersucht. Dabei konnte jeweils im Vergleich zu anderen Spezies gezeigt werden, dass es sich um acht bestimmte Nukleotidpositionen handelt, die zu Resistenz- vermittelnden Basenaustauschen neigen. Vier von diesen Positionen bewirken den Austausch von Aminosäuren, die direkt mit Rifampicin in Kontakt treten würden [154].

### 1.3.7 Vancomycin

Zu den Glykopeptid-Antibiotika zählt Vancomycin. Seine antibiotische Eigenschaft erhält es durch die Fähigkeit, den Prozess des Zellwandaufbaus bei gram-positiven Bakterien zu beeinflussen.

Die Mureinschicht bei Bakterien ist eine Anordnung von parallel angeordneten Peptidoglykanketten, welche über Oligopeptide miteinander quervernetzt werden. Vancomycin bindet die endständige D-Alanin-Gruppe einer solchen Oligopeptidgruppe und hindert so im Prozess der Quervernetzung die Transpeptidase bei der

notwendigen Abspaltung der endständigen D-Alanin-Gruppe. (Abb. 1. 3) Somit kann kein stabiler Mureinsacculus gebildet werden und die Zelle stirbt bei Wachstum oder Zellteilung ab [94].

Als Reserveantibiotikum wird Vancomycin in der Regel nur bei Infektionen mit oxacillinresistenten Staphylokokken und methicillinresistenten Enterokokken eingesetzt, jedoch wird es auch in Kombination mit Rifampicin bei Infektionen mit *B. anthracis* empfohlen [8, 29].

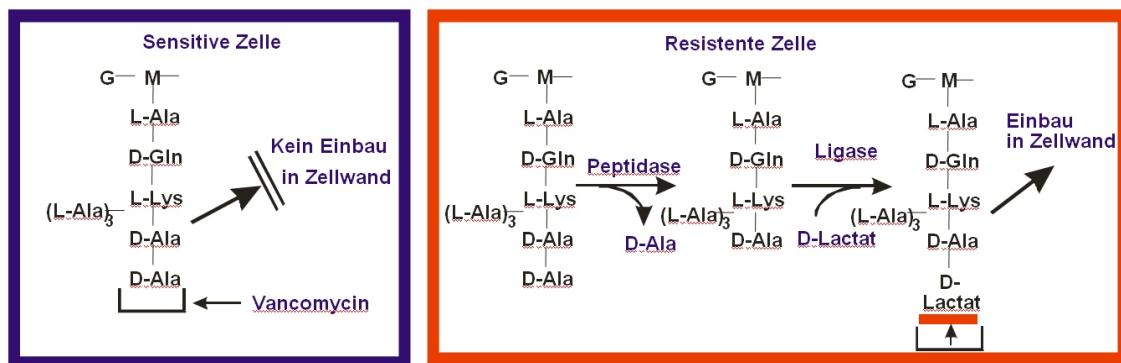


Abb. 1.3: Schema der Wirkungsweise von Vancomycin und Mechanismus einer Vancomycin-Resistenz. G: N-Acetylglucosamin, M: N-Acetylmuramin

Der Wirkungsmechanismus einer Vancomycinresistenz liegt in einem ausgeklügelten Regulations- und Umprogrammierungssystem. Die Resistenzgene sind auf den mobilen Elementen innerhalb regulierender Operons angeordnet. Die übertragenen Gene sind so in der Lage, bei Vorhandensein von Vancomycin den Aufbau der Peptidoglykane derart zu verändern, dass an Stelle des endständigen D-Alanins einer Seitenkette der Muraminsäure ein D-Lactat eingebaut wird, dessen Bindungsaffinität mit Vancomycin um das 1000fache reduziert ist. Im weiteren Verlauf steht dann dieses D-Lactat somit für eine Quervernetzung der Peptidoglykane zur Verfügung (Abb.1.3).

Genotypisch sind diese Resistenzen gegen Vancomycin am besten bei Enterokokken untersucht und beschrieben worden. Dabei werden die bisher entdeckten Resistenzgene in zwei Klassen eingeteilt:

Zum einen die intrinsischen, zu denen *vanC1* und *vanC2/C3* gehören und zum anderen die erworbenen Resistenzgene. Zu diesen zählen *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* und *vanG*. Eine Übertragung der zuletzt genannten zwei Gene in andere Spezies konnte bisher noch nicht gezeigt werden [54, 96] und auch eine Übertragung von *vanD* auf andere Spezies ließ sich nicht nachweisen [49]. Somit bleiben für dieses Projekt

der Nachweis der Resistenzgene *vanA* und *vanB* von Interesse. *vanA* wurde bereits von Ligozzi *et al.* [90] in einem klinischen Isolat von *Bacillus circulans*(Y15704) nachgewiesen. *vanB* liegt ebenfalls wie *vanA* auf einem Transposon [93]. Damit bestände potentiell die Möglichkeit, auch dieses Gen auf einen anderen Organismus zu übertragen.

Phänotypisch lässt sich mittels eines Antibiotogramms die Expression von *vanA* und *vanB* unterscheiden. Während ein *vanA*-resistenter Stamm eine sogenannte „High-Level“ Resistenz gegen Vancomycin (VAN) und Teicoplanin (TEI) aufweist, hat das Vorhandensein von *vanB* lediglich eine „High-Level“-Resistenz gegenüber Vancomycin zur Folge. Dies liegt daran, dass durch die leicht unterschiedliche Struktur des Teicoplanins das VanB-Operon nicht induziert werden kann.

### 1.3.8 Streptomycin und Gentamicin

Aminoglycosid-Antibiotika, zu denen auch Streptomycin und Gentamicin gehören, greifen in die Translation ein [94]. Aufgrund ihrer Struktur als hydrophile Zucker mit vielen Aminogruppen, die bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegen, haben sie die Möglichkeit an der polyanionischen A-Bindungsstelle für Aminoacyl-tRNAs in der 30S-Untereinheit der Ribosome zu binden und somit eine Elongation der Aminosäurekette zu behindern.

Das erste Aminoglycosid-Antibiotikum Streptomycin wurde 1944 von Waksman entdeckt. Aufgrund seiner Wirkung auf eine Anzahl von säurefesten und gram-negativen Bakterien, die damals von Penicillin nicht erfasst werden konnten, wurden in dieses Antibiotikum große Hoffnungen gelegt [70]. Streptomycin war die erste Substanz, welche zur Bekämpfung von Tuberkulose eingesetzt wurde und heute nicht nur zur Behandlung von Infektionen mit *M. tuberculosis*, sondern auch mit *Yersinia pestis* empfohlen wird [8, 29].

Die Art der Resistenz gegen die Gruppe der Aminoglycosid-Antibiotika ist auf eine Modifizierung des Antibiotikums zurückzuführen.

Unterschieden werden die Modifikationen hinsichtlich ihrer Art: Phosphorylierung, Adenylierung und Acetylierung (Abb 1.4). Allein aufgrund der Anzahl der möglichen Modifikationsstellen gibt es eine Vielzahl von Mechanismen, die wiederum durch eine unterschiedliche Anzahl von Genen kodiert werden. Jedoch weisen die verschiedenen Aminoglycosid-Resistenzgene ein genaues Wirkungsspektrum auf, welches die Anzahl der für diese Arbeit relevanten Gene deutlich zu reduzieren vermag [165, 166, 134, 152].

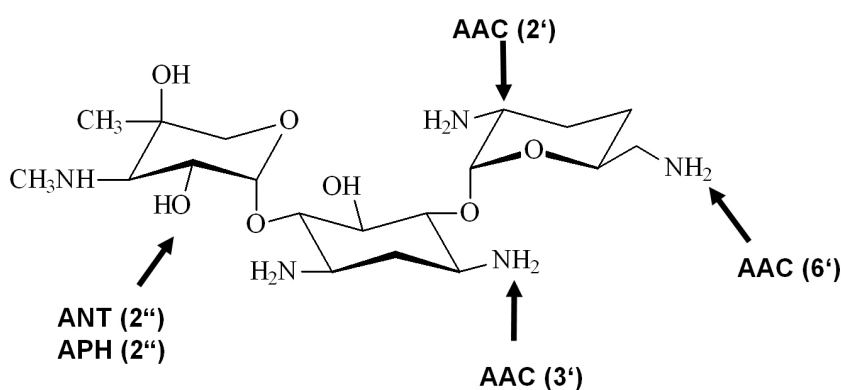


Abb. 1.4: Angriffsmöglichkeiten für Aminoglycosid-modifizierende Enzyme; hier am Beispiel von Gentamicin. ANT: Adenylylierung, APH: Phosphorylierung, AAC: Acetylierung

Die Vielzahl der Resistenzgene lässt eine eindeutige Nomenklatur für diese Arbeit unabdingbar erscheinen, was jedoch weltweit nicht von allen Arbeitsgruppen unterstützt zu werden scheint. Der Vergleich von Einträgen in „GenBank“ und der unter diesen Namen eingetragenen Sequenzen belegen dies. Bei unserer Arbeit orientieren wir uns an der vorgeschlagenen Nomenklatur von Shaw *et al.* [134] und werden vollständig auf die Verwendung von alternativen Namen verzichten, da diese zum Teil keinen eindeutigen Charakter aufweisen.

Drei Gene sind bereits bei *Yersinia pestis* beschrieben worden: *aac(3)-IVa*, *aph(3'')*-*Ib* und *aph(6)-Id*. Das erste bewirkt eine Resistenz gegenüber Gentamicin und wurde in *Yersinia pestis* von der Gruppe von Herrn Schweizer kloniert [37], die beiden zuletzt genannten Gene wurden auf einem Multiresistenz-Plasmid in einem *Yersinia pestis*-Isolat auf Madagaskar von Marc Galimand *et al.* isoliert [59]. Gerade das Auftreten eines solchen Isolats ließ die Wissenschaft aufhorchen und veranlasste die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) zu einer Publikation, in der sie zu erhöhter Aufmerksamkeit auf das Vorhandensein ähnlicher natürlicher Isolate aufrufen [48].

Zusätzlich zu erworbenen Genen besteht auch die Möglichkeit für den Organismus durch Mutation im Gen *rpsL* eine Streptomycinresistenz zu erwerben [21, 103], was bereits mehrfach bei *E. coli* gezeigt werden konnte. Dieses Gen codiert das ribosomale Protein S12. Stern *et al.* haben die Bindestellen zwischen 16SrRNA und dem S12-Protein identifiziert, welche gleichzeitig die möglichen Bindungsstellen für das Antibiotikum Streptomycin darstellen [141]. Mutationen in diesem Protein, die eine Resistenz gegen Gentamycin bewirken, konnten nicht gefunden werden. Auch

konnte keine Kreuzresistenz zwischen Streptomycin und Gentamicin als Ergebnis einer Mutation im Gen *rpsL* gezeigt werden [147, 61]. Jedoch wurde bei dieser Art von Mutanten eine gleichzeitige Attenuation der Pathogenität beobachtet [7], womit ihnen beim Infektionsverlauf eine unbedeutende Rolle nachgesagt wurde.

### 1.4 Diagnostik in der klinisch-bakteriologischen Routine

Infektionen, die von hochpathogenen Erregern hervorgerufen werden, verlaufen in der Regel deutlich schneller als bei anderen klinischen Erregern. Hinzu kommt ein schwerer Infektionsgrad und -verlauf. Aus diesem Grund ist eine schnelle und erregerspezifische Behandlung beim Patienten unerlässlich.

Zu der routinemäßigen klinischen Diagnostik gehört nach Erhalt einer Probe die Erregerisolierung. Diese wird in der Regel auf Agarplatten über Nacht durchgeführt. Die phänotypische Resistenzprüfung findet unmittelbar im Anschluss daran statt und benötigt eine weitere Inkubationsphase über Nacht. Dazu greift man entweder auf kommerziell erhältliche Systeme zurück oder bestimmt auf klassische Weise, wie zum Beispiel durch den Agar-Diffusionstest oder den Mikro-Dilutionstest den Isolat-spezifischen MHK-Wert. Bei diesem Wert handelt es sich um den Mindest-Hemm-Konzentrationswert, der angibt, ab welcher Konzentration ein Antibiotikum bei dem untersuchten Isolat wachstumshemmend wirkt. Dabei wird das Isolat in Vertiefungen mit Nährbouillon und einer ansteigenden Antibiotikumkonzentration ausgesetzt. Nach einer Nacht-Bebrütung wird dann das Wachstum in jeder Vertiefung überprüft. Durchgeführt werden diese Tests gemäß den Standards DIN58940 Teil 8 oder CLSI M100-S15. Abbildung 1.5 zeigt ein bearbeitetes Foto einer Testplatte mit 18 verschiedenen Antibiotika.

Da unter anderem wegen der möglichen Bedrohung durch terroristische Anschläge mit Infektionserregern neue Anforderungen hinsichtlich der Untersuchungsdauer in der Diagnostik entstanden sind, haben in den letzten Jahren neue Methoden aus verschiedenen Forschungsbereichen zur Identifizierung und Resistenzbestimmung Einzug in die Labore gehalten [106]. Dazu zählen vorallem chromogene Medien, Real-Time-PCR und Microarrays.



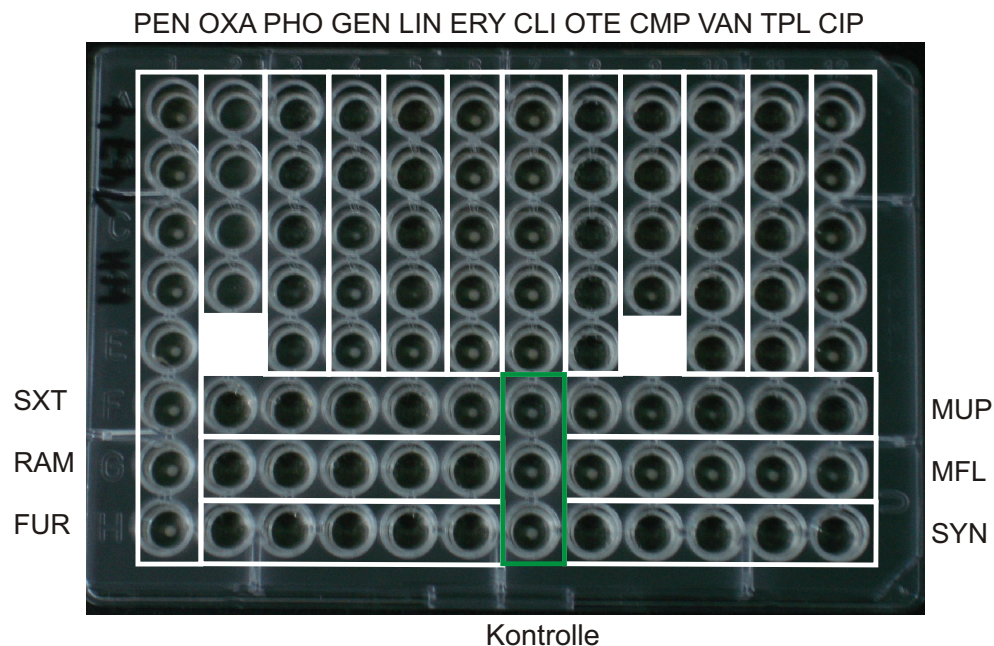


Abb. 1.5: Beispiel einer MHK-Platte zur Untersuchung von 18 verschiedenen Antibiotika

## 1.5 Mikroarrays

### 1.5.1 Einführung

Unter einem DNA-Mikroarray oder „DNA-Chip“ versteht man eine Anordnung einer Vielzahl von einzelsträngigen DNA-Molekülen, die an einer Oberfläche gebunden sind. Diese Sonden oder „Fängermoleküle“ werden benutzt, um Test-DNA auf bekannte Sequenzen hin zu untersuchen, indem man das Prinzip der komplementären Basenpaarung (Hybridisierung [95]) von DNA-Molekülen ausnutzt.

Eine erste derartige Hybridisierung gelang 1965 Gillespie und Spiegelman auf einer Membran, welche mit nur einer Sonde durchgeführt wurde [62]. Dabei war jedoch die Test-DNA an die Membran gekoppelt und eine Sonde in Lösung. Noch heute wird der methodisch gleich aufgebaute Southern-Blot [136] im Labor oft eingesetzt. Auch hier wird lediglich mit einer Sonde hybridisiert.

Den entscheidenden Schritt zum Einsatz von mehreren Sonden gleichzeitig machte Saiki *et al.* [126], als er 1989 die Hybridisierung von markierter Ziel-DNA an 17 auf einer Oberfläche fixierten Sonden beschrieb. Die Oberfläche des „reverse dot blots“ war zu diesem Zeitpunkt ebenfalls noch eine Membran. Als es Schena *et al.*

1995 gelang [130], Glas als Oberfläche zu verwenden und an diese DNA-Nukleotide zu koppeln, war der Durchbruch für die Mikroarrays gelungen. Durch die Wahl eines glatten Materials, das auf der gesamten Fläche die gleichen Eigenschaften aufwies, war es möglich, eine Miniaturisierung und Automatisierung zu entwickeln. 10.000 Sonden fixierte bereits so Schena *et al.* auf der Fläche eines Glasobjektträgers [130]. Durch Weiterentwicklung der Oberflächenchemie und *in-situ*-Synthesen sind heutzutage bis zu 1.3 Millionen Sonden auf einem Array zu finden ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)).

Arrays werden aufgrund ihrer Sondendichte in zwei Gruppen aufgeteilt: Ein Makroarray hat weniger als 500 Spots/cm<sup>2</sup> („Features“/cm<sup>2</sup>), ein Microarray hingegen mehr als 500 Spots/cm<sup>2</sup>. Diese Grenzwerte sind im Affymetrix „GeneChip“ Patent definiert [41].

Hergestellt wird ein Microarray entweder durch das Aufbringen von vorsynthetisierten Sonden oder durch die bereits erwähnte *in-situ*-Synthese.

Nicht nur anhand der Sondendichte werden die Arrays klassifiziert, sondern auch im Hinblick auf die jeweilige Sondenlänge. Je nach untersuchter Fragestellung können lange Doppelsträngige DNA-Moleküle (0.5 bis 2.0 kb), „Langmere“ (50 bis 70 nt) oder Oligonukleotide (10 bis 25 nt) als Sonden eingesetzt werden [171]. Die unterschiedlich eingesetzte Länge der Nukleotidsonden hat erheblichen Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität. Während lange Sonden wie PCR-Produkte eine Sequenzhomologie von 80 bis 85% unterscheiden können und dabei ca. 1ng an nachweisbarer Ziel-DNA benötigen, kann man mit kurzen Oligonukleotiden (18 bis 25nt) Punktmutationen abfragen, was jedoch in der Regel einen vorherigen DNA-Anreicherungsschritt zum Beispiel in Form einer PCR mit sich zieht [171].

### 1.5.2 Herstellung von Mikroarrays

Um Mikroarrays herzustellen gibt es drei unterschiedliche Methoden: Die lichtgenerierte Herstellung orts aufgelöster Strukturen, die Adressierung von DNA-Molekülen mittels elektrischer Ladung und die orts aufgelöste Mikrostrukturierung von modifizierten Trägern durch Mikrodispensierung. Bei dieser Arbeit wurde die Technik der orts aufgelösten Mikrostrukturierung verwendet, welche näher erläutert werden soll.

#### Orts aufgelöste Mikrodispensierung

Bei der orts aufgelösten Mikrodispensierung auf modifizierten Trägern werden bereits synthetisierte DNA-Fragmente auf eine Oberfläche aufgebracht. Dabei besteht die

Möglichkeit der Nutzung des sogenannten Kontaktverfahrens, bei der die Oberfläche während der Ablage der zu immobilisierenden DNA berührt wird. Dabei werden in erster Linie Nadeln, Stifte und Mini-Pinzetten eingesetzt. Vor dem Benetzen des Trägers werden kleine Volumina durch Kapillarkräfte in Vertiefungen des Spotting-„Pins“ aufgenommen und durch repetitiven Kontakt des Trägers nach und nach in kleinsten Volumina abgegeben.

Bei der kontaktfreien Variante wird ähnlich einem Tintenstrahldrucker die aufzutragende Probe präzise in kleinsten Volumina oberhalb der Oberfläche des Trägers abgegeben. Je nach angewandeter Technik können so Tropfen mit einem Volumen im Picoliter-Bereich reproduzierbar auf eine Oberfläche aufgebracht werden. Ein Verfahren, das solche kleinen Volumina abgeben kann, ist die Piezo-Ink-Jet-Technik, die den Geräten der TopSpot-Technologie zugrunde liegt.

Zwingend bei der Technikwahl der orts aufgelösten Mikrodispensierung ist die Verwendung von einer Immobilisierungsstrategie, um die späteren Sonden auf der Trägeroberfläche zu fixieren.

### Modifizierte Trägeroberflächen

Als Alternative zur fotolithografischen Herstellung von Mikroarrays steht das entwickelte Druck-Verfahren zu Verfügung [64, 24, 20].

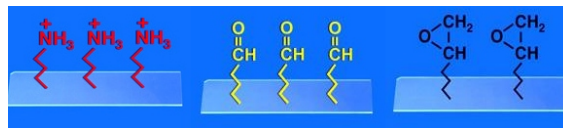


Abb. 1.6: Geläufige funktionelle Gruppen. Von links nach rechts: Amino-, Aldehyd-, Epoxy-Silane. ([www.arrayit.com](http://www.arrayit.com))

Hierbei werden die einzelnen Sonden zuvor synthetisiert und anschließend mechanisch auf eine Oberfläche aufgebracht. Um eine Fixierung der Sonden auf der Oberfläche vornehmen zu können, wird in der Regel die Sonde mit einer chemischen Modifikation (Bsp.: Amino- oder Phosphatgruppe) versehen. Die Wahl der Modifikation hängt hierbei stark von der verwendeten Oberfläche ab. Als Grundsubstanz der Oberfläche wird in der Regel ein Silanobjektträger verwendet, der mit verschiedenen Reagenzien behandelt wird, um die funktionellen Gruppen auf der Oberfläche gestalten zu können. Geläufige Systeme der Oberflächenchemie bei Mikroarrays sind Aminosilan, Epoxysilan, Aldehyde, Thiocyanate und Derivate (Abb. 1.6). Einen gut strukturierten Übersichtartikel veröffentlichte Pirrung *et al.* [113].

### 1.5.3 Markierung der zu untersuchenden DNA

Um die Menge der auf dem Microarray gebundenen DNA messen zu können, muss die eingesetzte DNA markiert werden. Dies kann auf unterschiedliche Weise passieren und findet in der Regel vor der Hybridisierung durch den Einbau von radioaktiven oder fluoreszenten Nukleotiden statt.

Nach der Hybridisierung und dem Abwaschen ungebundener DNA ist es somit direkt mit Hilfe von Phosphoimagern oder Fluoreszenzscannern möglich, gebundene DNA nachzuweisen. Dieser Art des direkten Nachweises steht der indirekte Nachweis gegenüber.

Bei der indirekten Methode werden enzymatisch markierte Nukleotide in die Ziel-DNA eingebaut; alternativ kann diese auch chemisch markiert werden. Nach der Hybridisierung findet nun ein Nachweis der Markierung statt, indem man die vorher eingebauten Moleküle beispielsweise durch ein fluoreszierendes Protein oder eine Fällungsreaktion nachweist. Erst nach Sichtbarmachung der Markierung kann diese nachgewiesen werden.

Eine Übersicht über verschiedene Markierungs- und Detektionsmöglichkeiten mit einem beispielhaften Literaturverweis zeigt Tabelle 1.2.

Wichtig bei allen eingesetzten Systemen ist eine hohe Reproduzierbarkeit mit einer stabilen Markierung sowie ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis und eine einfache Handhabung. Neben der Verwendung von Chemilumineszenz, radioaktiver Isotope oder spezifischer Enzymreaktionen ist die Fluoreszenzmarkierung so empfindlich, dass sogar Einzelmoleküle detektiert werden können [151].

## 1.6 Microarrays in der Diagnostik

DNA-Microarrays stehen für Detektion im Multiplex-Maßstab. Mit ihnen ist es möglich, eine Vielzahl unterschiedlichster genetischer Informationen in einem Experiment abzufragen und zu vergleichen. Gerade im Bereich „Genotyping“ sind in letzter Zeit viele Arbeiten veröffentlicht worden [104], die erkennen lassen, wieviel Aufmerksamkeit dieser Technologie gewidmet wird. Der Fragestellung sind dabei nur selten Grenzen gesetzt. Die Anwendung reicht von Genexpressionsstudien über random hybridization fingerprints, vergleichende Genom-Hybridisierungen, Multi-Locus-Sequence Typing, phylogenetische Studien bis hin zur Detektion von Genen involviert in Virulenz, Antibiotikaresistenz oder Metabolismus.

Tab. 1.2: Übersicht möglicher Markierungs- und Nachweismethoden

lfd. Nr.	Nachweis- methode	Markierungs-Modifikation der Targets vor Hybridisierung	Nachweisart der hybridisierten DNA	Lit.	Detektionsgerät
1	direkt	enzymatisch	Einbau von fluoreszenten Nukleotiden	[16]	Fluoreszenzscanner
2			Einbau von radioaktiven Nukleotiden	[3]	Phosphorimager
3	indirekt	enzymatisch	Einbau von biotinylierten Nukleotiden	[46]	Fluoreszenzscanner
4			Einbau von mit Biotin oder Dinitrophenol modifizierten Nukleotiden	[111]	Durchlichtscanner
5		keine Modifikation notwendig	Verlängerung mit fluoreszenten Nukleotiden	[110]	Fluoreszenzscanner
6	indirekt	chemisch	Psoralen	[144]	Fluoreszenzscanner
7			Zugabe von nano-Gold-Partikeln mit einzelsträngiger DNA-Sonde	[108]	Durchlichtscanner

Gerade im Bereich der klinischen Diagnostik werden immer mehr Forschungsarbeiten veröffentlicht, bei denen Microarrays verwendet werden. Im Bereich der Identifikation von Mikroorganismen und deren Virulenzfaktoren sind dies zum Beispiel die Organismen *Listeria* [157], *Campylobacter* spp.[156], *B. anthracis* [105, 28], Influenza B [83] oder Virulenzfaktoren bei *Staphylococcus aureus* [132]. Auch für *Salmonella* Serovare und *E. coli* wurden Arrays entwickelt [36].

Ebenso galt ein besonderer Augenmerk den Antibiotikaresistenzen und deren Detektion. Dabei wurden eine Vielzahl von Arrays entwickelt, welche sich in erster Linie auf die Detektion von Resistenzgenen berufen [30, 158, 111, 36, 155]. Aber auch Punktmutationen, die Resistenzen hervorrufen, wurden untersucht [168, 167, 47, 159, 65, 169, 17, 42]. Innerhalb dieser Arrays gibt es unterschiedliche Aufbaustrategien, welche sich hinsichtlich der Sondenwahl unterscheiden. Während Yu [168, 167] und Grimm [65] für jede zu untersuchende Nukleotid-Position vier Sonden einsetzen, um alle vier möglichen Nukleotide zu diskriminieren, verwenden Yue und Booth nur zwei Sonden zur Unterscheidung von einer Wildtyp-Sequenz zu einer mutierten. Dies spart zwar Kosten und Zeit bei Entwicklung und Produktion, aber ein neu auftretender Basenpaaraustausch an einer bereits bekannten und untersuchten Stelle wird nicht sofort erkannt.

Weitere Entwicklungen im Bereich der Real-Time-Hybridisierungen auf einer Oberfläche sind in Angriff genommen. Dabei soll die Hybridisierung online verfolgt werden und somit schon während der Hybridisierung Mismatch- von Perfect-Match-Sonden unterschieden werden können [14]. Auch weitere Verbesserungen der Sensitivität scheinen möglich; so soll man mit Hilfe eines beschriebenen Assays [53] z.B. eine einzelne Gen-Kopie nachweisen können.

## 1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Medikation von Personen nach Exposition oder zur Prophylaxe gegen hochpathogene Bakterien muss schnellstmöglich und effektiv erfolgen [35, 123], wobei gemäß Empfehlungen Erreger-spezifische Antibiotika verabreicht werden. Bei *B. anthracis* sind dies Ciprofloxacin, Doxycyclin, Amoxicillin, Rifampin und Vancomycin; bei *Yersinia pestis* Ciprofloxacin, Tetracyclin, Streptomycin und Gentamicin [18, 19, 22, 63, 80, 81]

Da die Behandlung infizierter Personen in der Regel im klinischen Alltag ohne Überprüfung der Resistenzeigenschaft des Erregers geschieht, ist eine Diagnostik

zur Überprüfung dieser Eigenschaft als nützlich einzustufen.

Zu diesem Zweck sollten zunächst, gemessen an der klinisch-pharmakologischen Relevanz, mögliche Resistenz-vermittelnde genetische Determinanten zusammengestellt und diese aufgrund von Literaturrecherchen hinsichtlich ihres biologischen Vorkommens beurteilt werden. Weiterhin sollte eine Auswahl relevanter Antibiotika-Resistenz-vermittelnder Gene und Mutationen erstellt werden. Für diese Auswahl sollten im Anschluss Sonden *in-silico* für den zukünftigen Microarray entwickelt werden.

Gleichzeitig mussten sowohl relevante Ciprofloxacin- als auch Rifampicin-resistente Mutanten von *B. cereus* ATCC10987 selektiert werden, da keine resistenten Wildisolate vorhanden waren. Diese mussten phänotypisch und genotypisch charakterisiert werden. Für neu aufgetretene Mutationen sollten ebenfalls Sonden *in-silico* entwickelt werden, um sie später auf dem Microarray nachweisen zu können.

Gleiches galt für *Yersinia pseudotuberculosis*, bei dem Ciprofloxacin-resistente Mutanten isoliert und anschließend geno- und phänotypisch untersucht werden mussten. Im Anschluss daran sollten auch hier für alle bekannten und eventuell neu zu beobachtenden Nukleotidpositionen mit Resistenz-vermittelnden Mutationen Sonden zur späteren Detektion und Identifikation erstellt werden.

Aus nachvollziehbaren Gründen der Biosicherheit sollten diese notwendigen Mutantenisolationen mit den Organismen *Y. pseudotuberculosis* und *B. cereus* durchgeführt werden und nicht mit *B. anthracis* oder *Y. pestis*.

Neben den Sonden zur Untersuchung von Punktmutationen sollten ebenfalls Sonden für alle relevanten möglichen erworbenen Resistenzgene erstellt und später mit Positivkontrollen evaluiert werden.

Für die Endanwendung war beabsichtigt, ein multiplexes Markierungsprotokoll zu entwickeln, das es ermöglicht, die untersuchten Proben schnell, effizient und reproduzierbar auf dem zukünftigen Microarray nachzuweisen.

Der entstandene Microarray sollte abschließend mit vorhandenen DNAs von *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* und Misch-DNA anderer Resistenzgene tragender Bakterien praxisnah evaluiert werden. Nach Erarbeitung einer passenden Auswert-routine sollte vor allem die Hybridisierungskinetik und Reproduzierbarkeit des Systems getestet und bewertet werden.

Nach der Evaluierung des Microarrays zur Untersuchung möglicher Resistenzen bei *Yersinia pestis* und nach der Bestimmung der Reproduzierbarkeit, sollte in einer durchgeführten Blind-Studie die klinische Endanwendung simuliert und das Ergeb-

nis im Anschluss diskutiert werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tab. 2.1: verwendete Geräte und Hersteller

Gerät	Firma
HeraSafe Reinraumbank	Kendro, Hanau
MS1 Minishaker	Roth, Karlsruhe
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
PTC 100	Biorad, München
PTC 200	Biorad, München
Dyad	Biorad, München
Mikrowelle	Siemens, München
Centrifuge 5017R	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad W13+D18	Thermo Electron, Karlsruhe
Feinwaage R180D	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer RH basic	IKA, Staufen
pH-Meter	WTW, Weinheim
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
GelDoc XR	Biorad, München
GenePix 4100	Axon Instruments, Union City, CA, USA
Phosphoimager FLA-2000	Fujifilm, Japan
Bunsenbrenner flammy S	Schütt Labortechnik, Göttingen
CMT-Hybridization Chamber	Corning Inc. Corning NY, USA
Schüttelinkubator TH30	Edmund Bühler, Hechingen
PowerPac 1000	Biorad, München

Fortsetzung nächste Seite ...

Gerät	Firma
Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Cryobank	Mast Diagnostica GmbH, Rein- feld
UV-Crosslinker	Vilbert Lourmant, Marne la Val- lee, Frankreich
Heracool	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Wasserbad W80	Roth, Karlsruhe
SmartSpec	Biorad, München
Gene Pulser II	Biorad, München

### 2.1.2 Chemikalien

Tab. 2.2: verwendete Chemikalien und Hersteller

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Invitrogen, Paisley, UK
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
SDS ultrapure	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-amino- methan	Applichem, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	JT Baker, Deventer, Holland
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Albumin, Bovine	Sigma, Steinheim
DNA-Leiter 100bp ext.	Roth, Karlsruhe
dNTP 100mM	Roth, Karlsruhe
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'- ethylcarbodiimid (EDC)	Fluka, Seelze
Ladepuffer	Roth, Karlsruhe
Fortsetzung nächste Seite ...	

Chemikalien	Hersteller
1-Methylimidazol	Fluka, Seelze
Oligonukleotide	Roth, Karlsruhe
Oligonukleotide	TipMolBiol, Berlin
Wasser	Roth, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe

### 2.1.3 Enzyme und Reagenziensysteme

Tab. 2.3: verwendete Enzyme und Reagenziensysteme sowie deren Hersteller

Enzym/Reagenziensystem	Hersteller / Lieferant
AmpliTaQ Gold	GE Healthcare Europe GmbH, München
HotTaq	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR-Puffer Gold II	GE Healthcare Europe GmbH, München
Reaktionspuffer Y	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
FluoroLink™ Cy 5 dUTP	GE Healthcare Europe GmbH, München
BigDye 3.1	Applied Biosystems
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Dye Spin Kit	Qiagen, Hilden
Klenow exo-minus	Biozym, Hess. Oldendorf

### 2.1.4 Software und Datenbanken

Tab. 2.4: verwendete Software und deren Hersteller

Software/Datenbank	Hersteller/Quelle
Office 2000	Microsoft
Fortsetzung nächste Seite ...	

Software/Datenbank	Hersteller/Quelle
MiKTeX	<a href="http://www.dante.de">www.dante.de</a>
TeXnicCenter	<a href="http://www.toolcenter.org">www.toolcenter.org</a>
ARB	TU München
QuantityOne	Biorad
Basread	Raytest GmbH, Straubenhardt
Aida	Raytest GmbH, Straubenhardt
GenePixPro 4.1	Axon Instruments
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast">www.ncbi.nlm.nih.gov/blast</a>
CBNP Microbial Programm	<a href="http://greengenes.llnl.gov/bbrp/html/microbe.html">greengenes.llnl.gov/bbrp/html/microbe.html</a>
TIGR Microbial Database	<a href="http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html">www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html</a>
Entrez-Genome	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome">www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome</a>
The Sanger Institut	<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/">www.sanger.ac.uk/Projects/</a>
mfold	<a href="http://www.idtdna.com">www.idtdna.com</a>
Hyther <sup>TM</sup>	<a href="http://ozone2.chem.wayne.edu/Hyther/hythermenuu.html">ozone2.chem.wayne.edu/Hyther/hythermenuu.html</a>

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Alle Puffer werden mit deionisiertem Wasser angesetzt und soweit nicht anders angegeben, autoklaviert und auf einen Liter aufgefüllt.

- 1-Methylimidazol-Lösung, 50mM: wässrig, pH6
- SDS-Lösung, 10%: wässrig
- 20x SSC, Stammlösung (Sambrook et al 2001 [127]): 300mM Natriumcitrat, 3M NaCl, wässrig, pH 7,4
- 50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), Stammlösung (Sambrook et al 2001 [127]) 2M Tris-Base, 2M Essigsäure 100%, 50mM EDTA, wässrig
- Tris-HCl-Lösung, 1M: wässrig, pH 8
- lowT-dNTP-Mix: 20pmol dATP, 20pmol dCTP, 20pmol dGTP, 10pmol dTTP, 20pmol Cy5-dUTP

- Waschpuffer I: 2x SSC, 0,1% SDS
- Waschpuffer II: 2x SSC
- Waschpuffer III: 0,2x SSC
- Prähyb-Puffer: 5xSSC, 1% BSA, 0,01%SDS
- TE-Puffer: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, wässrig
- EDTA-Lösung 0,5M: wässrig
- NaCl-Lösung 5M: wässrig

## 2.2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 2.5: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und Plasmide

Name Stamm bzw. Plasmid	relevante Gene	Quelle
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10987	wildtyp	Dr. Klee, RKI, Berlin
<i>Bacillus anthracis</i> BA369	wildtyp	Dr. Reissbrodt, RKI, Wernigerode
<i>Bacillus anthracis</i> BA338	wildtyp	Dr. Reissbrodt, RKI, Wernigerode
<i>Bacillus anthracis</i> BA340	wildtyp	Dr. Reissbrodt, RKI, Wernigerode
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	wildtyp	Prof. Tschäpe, RKI, Wernigerode
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> DSM8992	wildtyp	DSMZ, Braunschweig
<i>Yersinia pestis</i> IP554, IP568, IP670	wildtyp	Prof. Appel, BfR, Berlin
<i>Yersinia pestis</i> KIM3a, EV76	wildtyp	Dr. Klee, RKI, Berlin
<i>Yersinia enterocolitica</i> DSM4789	wildtyp	DSMZ, Braunschweig
<i>Staphylococcus aureus</i> 169-01	<i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i>	RKI, Wernigerode
<i>Enterococcus faecalis</i> UW700	<i>vanB</i>	RKI, Wernigerode
<i>Enterococcus faecium</i> UW1342	<i>vanA</i> , <i>tet(L)</i>	RKI, Wernigerode
<i>Escherichia coli</i> • R27	<i>tet(B)</i>	RKI, Wernigerode

Fortsetzung nächste Seite ...

Name Stamm bzw. Plasmid	relevante Gene	Quelle
<i>Escherichia coli</i> TOP10 • pCR1-Blunt II-TOPO:: <i>tet(D)</i>	<i>tet(D)</i>	Prof. Schwarz, FAL, Neustadt [55]
<i>Escherichia coli</i> • T99138	<i>aac(3)-IIa</i>	Dr. Tietze, RKI, Wernigerode
<i>Escherichia coli</i> • pIE723	<i>ant(2'')-Ia</i>	Dr. Tietze, RKI, Wernigerode
<i>Escherichia coli</i> • pIE970	<i>ant(3'')-Ia</i>	Dr. Tietze, RKI, Wernigerode
<i>Escherichia coli</i> • RSF1010	<i>aph(3'')-Ia, aph(6)-Id</i>	Dr. Tietze, RKI, Wernigerode
<i>Escherichia coli</i> • pBR322	<i>tet(C)</i>	Dr. Tietze, RKI, Wernigerode
pGM160	<i>aac(3)-Ia</i>	Prof. Piepersberg, Wuppertal
pHP45	<i>aac(3)-IVa</i>	Prof. Piepersberg, Wuppertal

## 2.3 Anzucht der verwendeten Bakterien

In dieser Arbeit wurden die folgenden Nährmedien verwendet. Dabei handelt es sich um Standardnährmedien, welche von der Firma Oxoid beziehungsweise Invitrogen (im Falle von S.O.C.-Medium) erworben und gemäß Protokoll aufbereitet wurden. Alle Nährmedien wurden autoklaviert.

- IsoSensiTest (IST)-Agar
- Nährbouillion (IST-Bouillion)
- Müller-Hinton-Blut(20%)-Agar
- S.O.C.-Agar
- Luria Bertani-Agar

## 2.4 Selektion von Mutanten

### 2.4.1 Selektion von Rifampicin-resistenten Mutanten

Die UV-Induzierung, Selektionierung und Charakterisierung von Rifampicin-resistenten *B. cereus* wurde analog zu den Versuchen von Vogler *et al.* [154] vorgenommen (Abb. 2.1). Dazu wurde eine 10ml Nährbouillion mit dem Wildtypstamm *B. cereus* ATCC10987 angeimpft und für 2,5 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler

inkubiert. Die so erhaltene Lösung mit einer Zelldichte von ca.  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen (McFarland 0,5) wurde in eine sterile leere Petrischale überführt und nach Abnahme von  $500\mu\text{l}$  mit 29mJ UV-Licht der Wellenlänge 356nm bestrahlt. Die verbleibenden 9,5ml wurden nach der Bestrahlung in  $500\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt, um die Unabhängigkeit der entstandenen Mutanten später gewährleisten zu können. Alle Aliquots wurden über Nacht in einem Thermomixer über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Pro Aliquot wurde jeweils eine Platte Müller-Hinton-Agar mit einer Konzentration von  $150\mu\text{g/ml}$  Rifampicin am nächsten Tag mit  $100\mu\text{l}$  beimpft. Nach einer 48h Bebrütung bei  $37^\circ\text{C}$  wurde von jeder Platte maximal ein gewachsener RIF-resistenter Klon isoliert und genotypisch durch PCR und anschließende Sequenzierung des Gens *rpoB* untersucht. Gleichzeitig wurde phänotypisch mittels Mikrobouillon-Test der dazugehörige MHK-Wert bestimmt.

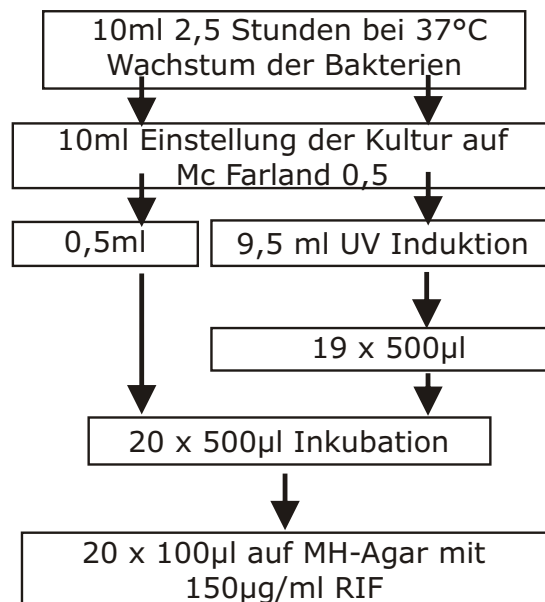


Abb. 2.1: Schematischer Ablauf der Herstellung von RIF-resistenten Mutanten

Zur genotypischen Charakterisierung wurde der für die RIF- Resistenz- vermittelnde Mutationen relevante Sequenzabschnitt des *rpoB*-Gens mit den Primern rpoB1 - F und rpoB1 - R (Anhang A1) amplifiziert und sequenziert.

### 2.4.2 Selektion von Ciprofloxacin-resistenten Mutanten

Die Selektion von spontanen Ciprofloxacin-resistenten Mutanten wurde vergleichbar zu Price *et al.* [115] auf Ciprofloxacinhaltigen Nährmedien durchgeführt (Abb. 2.2).

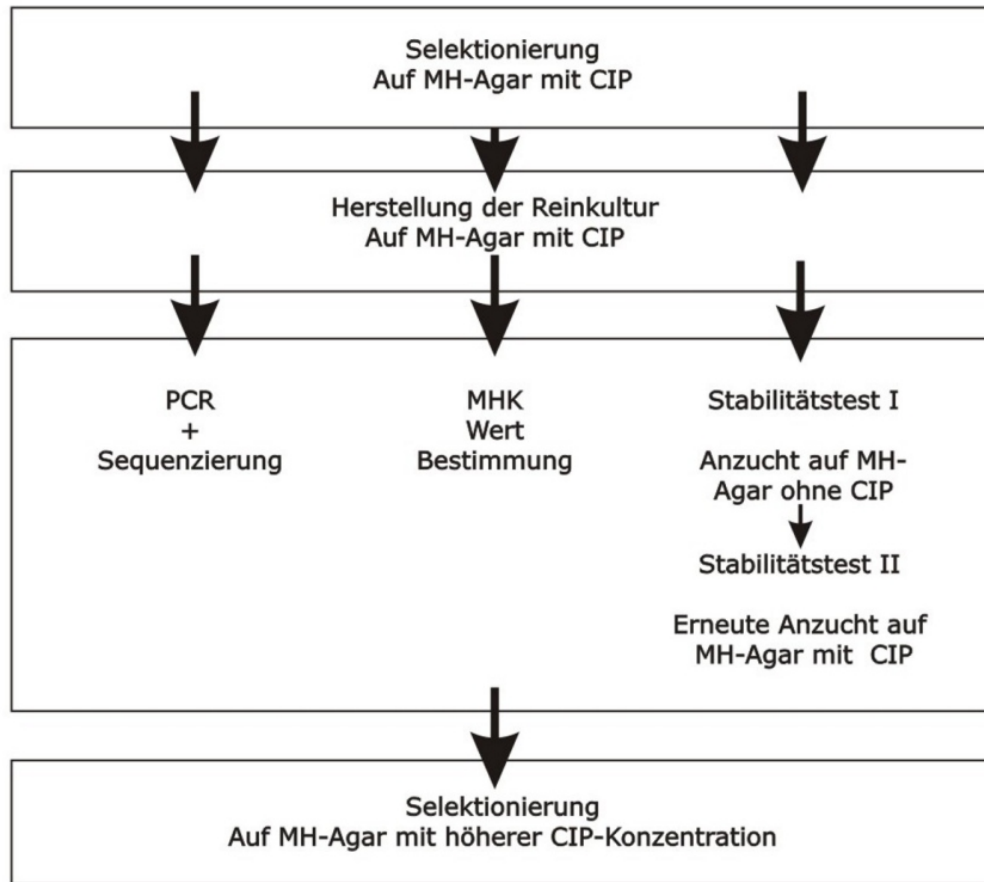


Abb. 2.2: Schematischer Ablauf der Selektionierung auf CIP-haltigem Medium

Nach Bestimmung des MHK-Werts des Ausgangsstamms *B. cereus* ATCC10987 wurden die Stämme über Nacht bei 37°C in Nährbouillon als Vorkultur bis zu einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^{11}$  Zellen angereichtert. Von dieser Vorkultur wurden nun 100 µl auf Müller-Hinton-Agar mit einer CIP-Konzentration von 0,25 µg/ml ausplattiert. Nach erfolgreicher Bebrütung wurde eine Kolonie auf MH-Agar mit derselben CIP-Konzentration isoliert und nach erneuter Anzucht molekularbiologisch und physiologisch charakterisiert. Dabei wurde zum einen eine PCR-Reaktion mit den Primern für das Gen *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE* durchgeführt und anschließend das erhaltene Produkt sequenziert, um mögliche Mutationen erkennen zu können. Zur phänotypischen Charakterisierung wurde der MHK-Wert für CIP mittels eines MHK-Mikrobouillontests bestimmt und die Stabilität der Mutation durch eine dreifache Zwischenkultivierung auf CIP-freiem Nährmedium durchgeführt. Nach erfolgreichem Abschluss der Untersuchungen wurden die erhaltenen Mutanten erneut



angereichert und auf MH-Agar mit einer Konzentration an CIP ausgestrichen, welche die zwei- bis dreifache Menge des bestimmten MHK-Wertes aufweis.

Die Selektion von Ciprofloxacin-resistenten *Y. pseudotuberculosis* wurde analog zu *Bacillus cereus* durchgeführt mit der Abwandlung, dass die Inkubationstemperatur bei 30°C lag und nur eine Generation an Mutanten isoliert wurde. Desweiteren wurde die genotypische Untersuchung bei *Y. pseudotuberculosis* auf das Gen *gyrA* beschränkt.

Alle verwendeten Primer sind in Anhang A 1 aufgeführt.

## 2.5 Mikrobiologische Techniken

### 2.5.1 MHK-Mikrobouilliontest

Die Mindest-Hemm-Konzentrationen (MHK-Wert) der untersuchten Organismen auf bestimmte Antibiotika wurde gemäß der Bestimmung M100-S15 des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) durchgeführt.

Zur Bestimmung des MHK-Werts eines isolierten Stammes wurden zwei bis drei Kolonien als Inoculum in 5ml Nährbouillon für drei Stunden bei 37°C auf einem Schüttler angezogen. Diese Lösung wird auf 0,5 McFarland-Standard Barium-Sulfate Turbidity ( =  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml ([149])) mit Nährbouillon eingestellt. Zur Bestimmung des MHK-Werts wurden 50µl dieser Zellsuspension mit 5ml NaCl-Lösung verdünnt (1:100) (Endkonz.  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml). 1µl dieser Suspension wurde jeweils in ein well einer präparierten Mikrotiterplatte pipettiert und bei 37°C über Nacht bebrütet. Die einzelnen wells der Mikrotiterplatten sind befüllt mit 50µl MH-Nährbouillon und weisen eine aufsteigende Konzentration an Antibiotikum auf.

### 2.5.2 Herstellung elektro-kompetenter Zellen

Bakterielle Zellen sind unter gewissen Umständen dazu befähigt, freie DNA aus dem umgebenden Milieu aufzunehmen und gegebenenfalls in ihr Genom zu integrieren. Um die bakteriellen Zellen „kompetent“ für die Aufnahme von DNA zu machen, wurde das nachfolgende Protokoll verwendet.

#### Material:

- Luria Bertani-Medium

- Glycerol, 10%, steril, eiskalt
- H<sub>2</sub>O, steril, eiskalt
- *Yersinia*- und *E.coli*-Zellen DH5a

**Durchführung:** Zur Gewinnung der kompetenten *Yersinia*-Zellen wurden 25ml Luria Bertani-Medium mit einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,4 bis 0,6 bei 27°C angezogen. Bei *Escherichia coli* DH5a wurde Luria Bertani-Medium mit Glucose bei einer Temperatur von 37°C verwendet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (5000rpm, 10min, 4°C). Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem sterilen H<sub>2</sub>O (25ml) gewaschen und anschließend zweimal mit 10% sterilem Glycerol in einem 1,5ml Reaktionsgefäß (3min, 14000rpm, 4°C). Die gewaschenen Pellets wurden in 80µl 10% sterilem Glycerol resuspendiert, in Aliquots zu je 40µl aufgeteilt und sofort bei -80°C eingefrosten.

### 2.5.3 Transformation mittels Elektroporation

Viele eingesetzte Techniken in der Molekularbiologie erfordern das Einbringen fremden Gen- oder Proteinmaterials. Da die Phospholipid-Doppelschicht der Plasmamembran eine hydrophobe Außen- und Innenschicht besitzt, sind alle polar geladenen Moleküle, einschließlich DNA und Protein nicht imstande durch die Membran ins Zellinnere einzudringen.

Viele Methoden sind entwickelt worden, um diese Membran zu überwinden und die Integration von Fremd-DNA bzw. Protein zu ermöglichen. Eine solche Methode ist die Elektroporation. Das Konzept der Elektroporation basiert auf der verhältnismäßig schwachen Natur der hydrophoben Phospholipid-Doppelschicht und ihrer hydrophilen Interaktionen sowie der Fähigkeit, sich nach Störung wieder spontan zusammenzusetzen. So kann eine schnelle Spannungsspitze Bereiche der Membran vorübergehend stören und polaren Molekülen das Passieren der Barriere ermöglichen. Durch das schnelle Versiegeln der Membran bleibt die Zelle weiterhin intakt und lebensfähig.

#### Material:

- *Yersinia*- und *E. coli* DH5a- Zellen, kompetent
- Plasmid-DNA (1bis2µg)

- S.O.C.-Medium, vorgewärmt
- Elektroporationsküvette (0,2cm Kondensatorenabstand)
- Gentamicin (20 $\mu$ g/ml)-MH-Agarplatten

**Durchführung:** 40 $\mu$ l kompetente Zellen wurden mit 1 bis 2 $\mu$ g Plasmid-DNA vermischt und der Ansatz in eine Elektroporationsküvette vorsichtig überführt. Die Elektroporation wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Spannung 2400V, Widerstand 200 $\Omega$ , Kapazität 25 $\mu$ F, optimale Entladungszeit: 5,0msec bei *Yersinia* bzw. 2400V, 400 $\Omega$ , 25 $\mu$ F; 10msec bei *E. coli*. Sofort nach der Elektroporation wurden die *Yersinia*-Zellen im vorgewärmten S.O.C.-Medium bei 27°C für eine Stunde und die *E.coli*-Zellen bei 37°C für zwei Stunden inkubiert und anschließend auf Gentamicin-MH-Agar als Selektionsmedium ausplattiert und bebrütet.

## 2.6 DNA-Präparation

### 2.6.1 DNA-Extraktion

#### Lösungen:

- Proteinase K 15mg/ml
- Ethanol 90 bis 100%
- Qiagen DNeasy Tissue Kit
- Lysostaphin

**Durchführung:** Die DNA der untersuchten Organismen wurde mit dem Qiagen DNeasy Tissue Kit gewonnen. Mit Ausnahme der Staphylokokken, bei denen anstelle von Lysozym Lysostaphin eingesetzt wurde, sind alle anderen Organismen gleich ihres Gram-Färbungs-Verhaltens gemäß dem Extraktionsprotokolls für Gram-negative Organismen behandelt worden.

## 2.7 DNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung von doppelsträngiger DNA wurde je nach Fragestellung entweder fotometrisch [127] oder mittels eines fluoreszenten Farbstoffs durchgeführt.

### 2.7.1 PicoGreen von Molecular Probes

Bei dem in dem PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent vorhandenen Farbstoff handelt es sich um ein Fluorophor, welches sich weder an einzelsträngige DNA, noch an RNA anlagern kann. Die Exzitationswellenlänge liegt bei diesem Farbstoff bei 480nm und die Emissionswellenlänge bei 520nm. Mit Hilfe dieses Assays ist es möglich, DNA-Konzentrationen in einem Bereich von von 25pg/ml bis 1000ng/ml zu messen. Die Messung erfolgt in Mikrotiterplatten; die Fluoreszenz wird mit Hilfe des Fluoreszenzscanners aufgezeichnet und mit der Software Aida gegen einen bekannten Mengenstandard bestehend aus  $\lambda$ -DNA verglichen und berechnet.

## 2.8 Amplifizierung der DNA durch PCR

Die Replikation der DNA durch eine hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase findet bei der optimalen Temperatur des Enzyms statt (72°C). Die DNA-Polymerase katalysiert den nukleophilen Angriff des 3'- OH- Endes des Primers auf das innerste Phosphoratom des neuen Desoxyribonucleotidtriphosphats (dNTP). Der Elongation folgt die Trennung des neusynthetisierten Strangs vom Template durch Schmelzen. Der Prozess kann mehrere Male wiederholt werden, was zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Segmentes führt.

### Lösungen:

- 10x PCR Reaktionspuffer II
- 10x Reaktionspuffer Y
- dNTP-Lösung (10 mM)
- BSA 0,1%
- Primerlösung 50  $\mu$ M Primer
- MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM)
- HotStart *Taq*-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)
- *Taq*-DNA-Polymerase Gold (5 U/ $\mu$ l)

Tab. 2.6: PCR-Ansatz für einzelnes Gen und *Yersinia*-Multiplex-PCR

Komponente	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer Y	5	1x
dNTP 10mM	1	0,2mM
Primer vorwärts 50 $\mu\text{M}$ , je	1	1 $\mu\text{M}$
Primer rückwärts 50 $\mu\text{M}$ , je	1	1 $\mu\text{M}$
Template	1-2	ca. 4ng
HotStart <i>Taq</i> (5U $\mu\text{l}$ )	0,25	1,25U
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu\text{l}$	

Tab. 2.7: PCR-Ansatz für *Bacillus*-Multiplex-PCR

Komponente	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer II	5	1x
dNTP 10mM	3	0,6mM
MgCl <sub>2</sub> -Lösung 25mM	8	4mM
BSA 0,1%	5	0,01%
Primer vorwärts je 50 $\mu\text{M}$	1	1 $\mu\text{M}$
Primer rückwärts je 50 $\mu\text{M}$	1	1 $\mu\text{M}$
Template	1-2	ca. 4ng
Ampli $Taq$ Gold (5U $\mu\text{l}$ )	0,25	1,25U
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu\text{l}$	

Für jeden im Anhang A 1 aufgelisteten Primer wurde bei einem Einzelansatz der in Tabelle 2.6 bzw 2.7 aufgeführte Ansatz pipettiert. Dabei wurde in der Regel 1 bis 2 $\mu\text{l}$  DNA der nötigen Verdünnung eingesetzt. Als Standard-PCR-Programm wurde der in Tabelle 2.8 dargestellte Programmablauf gewählt:

Tab. 2.8: PCR-Programm

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen
1	96°C, 7min	54°C, 30sec	72°C, 30sec	1
2	96°C, 30sec	54°C, 30sec	72°C, 30sec	28
3	96°C, 30sec	54°C, 30sec	72°C, 7min	1

**Durchführung:** Der PCR-Ansatz wurde entsprechend den Tabellen 2.6 und 2.7 vorbereitet. Als Negativkontrolle wurde in der Regel ein PCR-Ansatz ohne zugegebene DNA mitgeführt.

## 2.9 Überprüfung der Amplifikate

### 2.9.1 Gelelektrophorese

Die Ergebnisse der PCR wurden durch Agarosegelelektrophorese nach Sambrook *et al.* [127] überprüft.

#### Lösungen:

- TAE-Puffer 1x
- Ethidiumbromidlösung 2%ig
- Agarose
- Ladepuffer
- Standardgrößenmarker 100bp ext. (0,25 µg/µl)

**Durchführung:** Die Elektrophorese wurde mit 15 bis 20V pro cm Lauflänge durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel für 15 Minuten in einer 2%igen Ethidiumbromidlösung gefärbt, unter UV-Licht fotografiert und das Ergebnis archiviert.

### 2.9.2 Sequenzierung

Zur Verifizierung der PCR-Reaktion wurde eine Sequenzierung der erhaltenen Amplifikate durchgeführt. Dazu wurden alle bei einer Polymerasekettenreaktion gewonnenen Amplifikate sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit der Datenbank des National Centers for Biotechnology Information (NCBI) mittels einer BLAST-Analyse verglichen. Im Verlauf dieser Arbeit wurde das Cycle Sequencing selbst durchgeführt, während die sich anschließenden Aufreinigungen und Sequenzierungen von einem Sequenzierservice im Hause an Kapillarsequenzierern (ABI 3001b) durchgeführt wurden.

Das verwendete Cycle Sequencing ist ein enzymatisches Verfahren zur DNA-Sequenzierung. Dabei werden zu der zu sequenzierenden Probe Primer, eine DNA-Polymerase und unterschiedliche fluoreszenzmarkierte Dideoxynukleotide und Deoxynukleotide in einem Puffer hinzugegeben. Wird anstelle eines Deoxynukleotides ein Dideoxynukleotid eingebaut, so bricht die Elongation nach diesem ab, da die DNA-Polymerase zur Verlängerung mit weiteren Nukleotiden ein freies 3'-OH-Ende benötigt, welches an einem Dideoxynukleotid fehlt.

Bei der anschließenden Kapillarelektrophorese wandern die erhaltenen DNA-Fragmente gemäß ihrer negativen Ladung und korrespondierend zu ihrer Größe durch die Kapillare und werden von einem Laser angeregt. Die Emissionsspektren werden von einer CCD-Kamera aufgefangen und von einem Computer ausgewertet. Somit wird die Nukleotidabfolge bestimmt.

### Lösungen

- DNA 20ng
- BigDye® 2µl
- Primer 1µl
- ddH<sub>2</sub>O ad 10µl

**Durchführung:** Die zu sequenzierende DNA wurde gereinigt und ihre Konzentration durch Gelelektrophorese bestimmt. Im Anschluss daran wurde der Reaktionsansatz in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt und die Sequenzierungsreaktion im Thermocycler gestartet.

Tab. 2.9: Sequenzier-Programm

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen
1	96°C, 10sec	50°C, 5sec	60°C 4min	25

### 2.9.3 Markierung mit Cy5dUTP

Um später an Sonden gebundene DNA nachweisen zu können, muss die zu untersuchende DNA markiert werden. Hier wurden in einer enzymatischen Reaktion Cy5-dUTP in die DNA eingebaut. Bei einem Klenowfragment exo-minus handelt

es sich um die DNA-Polymerase II von *Escherichia coli*, der sowohl die 3'-5' Exonuclease als auch die 5'-3' Exonuclease als Korrekturlesemechanismus fehlt. Lagert sich das Klenowfragment an ein gebundenes Oligonukleotid an, so kann es an dessen 3'-OH-Ende ein zu dem markierenden DNA-Strang komplementäres Nukleotid anhängen. Wird nun beispielsweise anstelle eines unmarkierten dTTP ein markiertes dUTP eingebaut, so lässt sich der neu synthetisierte Strang entsprechend der Markierung nachweisen. Da es sich bei dem hier verwendeten Cy5 um eine fluorophore Gruppe handelt, kann die erfolgte Reaktion mit einem Fluoreszenzscanner überprüft werden.

### Lösungen:

- ca. 300ng DNA
- lowT-dNTP-Mix 4 $\mu$ l
- Klenow exo-Fragment 20U
- Klenow-Puffer 10x 5 $\mu$ l
- ddH<sub>2</sub>O ad 50 $\mu$ l
- Qiaquick PCR Purification Kit

**Durchführung:** Der Markierungsansatz wurde gemäß Tabelle 2.10 vorbereitet und nach einer drei-minütigen Denaturierung in einem kochenden Wasserbad sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 $\mu$ l lowT-dNTP-Mix und 20U Klenowfragment wurde die Lösung gut gemischt, kurz zentrifugiert und für 30min bei 37°C inkubiert.

Nach einer Aufreinigung mit dem Reinigungskit, um unverbrauchte Nukleotide abzutrennen, konnte ein erfolgreiche Ergebnis der Markierungsreaktion nach einer Gelelektrophorese mittels eines Fluoreszenzscanners überprüft werden.



Tab. 2.10: Markierungsreaktionsansatz

Komponente	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration
10x Klenowpuffer	5	1x
lowT-Mix (500 $\mu\text{M}$ )	4	40 $\mu\text{M}$
Primer je 50 $\mu\text{M}$	1	1 $\mu\text{M}$
Template	1-2	ca. 300ng
Klenow exo-minus(20U $\mu\text{l}$ )	1	0,4
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu\text{l}$	

### 2.9.4 Bestimmung der Einbaurate

Um ein möglichst starkes Hybridisierungssignal zu erhalten, benötigt man eine große Menge an markierter DNA. Um festzustellen, wie effizient die Markierungsreaktion durchgeführt wurde, wurde die Einbaurate an Cy5-dUTP bestimmt.

#### Lösungen:

- PicoGreen-Kit
- Cy5-Standard
- DNA

**Durchführung:** Zunächst wurden die markierte DNA und der Mengenstandard gemäß den Instruktionen des PicoGreen-Kits in Microtiterplatten vorbereitet. Der Cy5-Standard wurde ebenfalls analog zur Beschreibung des Kits behandelt, mit der Ausnahme, dass zu den Proben des Standards kein PicoGreen zugegeben wurde. Die so präparierte Microtiterplatte wurde im Anschluss mit dem Fluorimager zunächst bei 535nm und anschließend bei 635 nm gescannt. Die darauf folgende Quantifizierung des erhaltenen Bilds erfolgte mit der Aida-Software. Da durch die Software die DNA-Massen in „ng“ angegeben wurde und die vorhandene Cy5-Menge in „pmol“, wurden die erhaltenen DNA-Massen in „pmol“ umgerechnet. Dabei wurde die Formel 2.1 angewendet:

$$pmol = ng / (nt * 324,5) \quad (2.1)$$

mit  $nt$  = Anzahl der Nukleotide

$ng$  = PCR-Produktmasse in ng

$pmol$  = PCR-Produktmenge in pmol

Die Einbaurrate  $E$  ergibt sich nun aus dem Verhältnis der Anzahl der eingebauten Cy5-Nukleotide  $N_{Cy5-dUTP}$  pro DNA-Molekül  $N_{DNA-Molekuel}$ .

$$E = \frac{N_{Cy5-dUTP}}{N_{DNA-Molekuel}} \quad (2.2)$$

## 2.10 Microarrayherstellung

### 2.10.1 Kopplung der Sonden an die Oberfläche

Zur Immobilisierung der Sonden auf der Oberfläche wurden diese mit einer Phosphatgruppe am 5'-Ende bei der Synthese modifiziert. Unter Anwendung von 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDC)-Chemie wurde diese Gruppe aktiviert, durch das Spotten auf den Träger aufgebracht und an die Aminofunktion des modifizierten Silanobjektträgers kovalent gekoppelt [131].

Im Spottingpuffer enthaltenes DMSO wird zur Erhöhung der Viskosität der Flüssigkeit eingesetzt, mit dem Zweck, später auf dem Objektträger eine langsamere und gleichmäßigere Verdunstung des Lösungsmittels zu erhalten, was dann wiederum eine größere Homogenität der Sondenkonzentration des Spots zur Folge hat.

#### Lösungen

- EDC
- DMSO
- Methylimidazol, pH 6,0

**Durchführung:** Die verwendeten Sonden wurden mit 2x Spottingpuffer (12,5% DMSO, 15mM Methylimidazol, 2,5mg/ml EDC) zu einer Endkonzentration von  $30\mu\text{M}$  verdünnt und anschließend in den Druckkopf des Arrayers gefüllt.

### 2.10.2 Spotten der Microarrays

Die verwendeten Microarrays wurden mit einem TopSpot-Gerät hergestellt. Dabei handelt es sich um ein Gerät, das über ein Piezoelement ein Druckmodul steuert,

welches bis zu 1pl kleine Volumina der Sondenlösung auf eine Trägeroberfläche abgeben kann. Das Spotten wurde für die Vorversuche in unserem Labor durchgeführt und für die endgültige Version des *Bacillus-anthraxis*-Resistenzchips von unserem Kooperationspartner, dem Fraunhofer Institut für Biomedizin Technik in Bergholz-Rehbrücke.

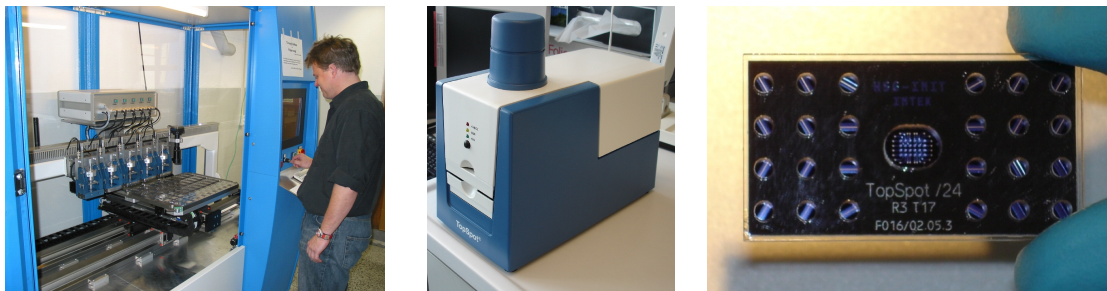


Abb. 2.3: Fotos der verwendeten Spotter (TopSpot Modular Arrayer am Fraunhofer IBMT, links; TopSpot E, Mitte) und 24er Druckkopf (rechts)

Abbildung 2.3 zeigt Bilder der verwendeten Spotter und eine Vergrößerung eines verwendeten Druckkopfs. Für den Druckvorgang auf Nexterion A+ Slides wurden für den TopSpot Modular Arrayer folgende Parameter verwendet: Stroke: 69%, Spannung: 8,28ms Höhe: 14,8 $\mu$ m. Für den TopSpot E waren die Spottingparameter: Downspeed: 380 $\mu$ m/ms, Stroke: 50 $\mu$ m, Holdtime: 20 $\mu$ s, Upspeed: 7 $\mu$ m/ms.

### 2.10.3 Layout

Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit treffen zu können, wurden von den Sonden beim Spottingvorgang räumlich getrennte Replikate auf der Hybridisierungsfläche abgesetzt. Bei dem Microarray „BaRes“ waren dies vier, bei dem Microarray „Ypres“ waren dies sechs Replikate (Abb. 2.4).

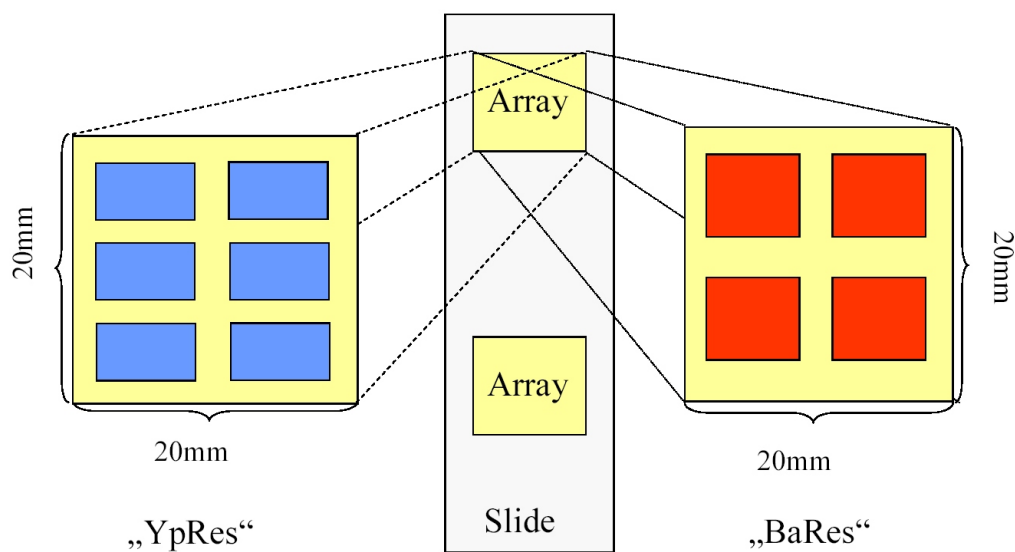


Abb. 2.4: Layout des Mikroarrays. Jeweils zwei Arrays wurden auf einen Slide gespotet. In diesen waren je nach Projekt vier bzw. sechs räumlich voneinander getrennte Sondenreplikate aufgebracht worden

### „BaRes“ - Bacillus anthracis-Resistenzchip

		CIP7	CIP6	CIP5	CIP4	CIP3	CIP2	CIP1		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	SpKontrolle	vanA	parC253Gwt	parC242Awt	gyrB1423Awt	gyrB1309Gwt	gyrA266Awt	gyrA265Gwt	gyrA254Cwt	SpKontrolle
2	tetM	vanB	A	T	G	A	C	A	T	Spkontrolle
3	tetO	vanAB	C	A	C	C	T	C	G	neg Hyb
4	tetOM	tetK	T	G	T	T	G	T	A	pos Hyb
5	tetL1	rpoB1459Cwt	rpoB1448Awt	rpoB1444Awt	rpoB1443Cwt	rpoB1420Awt	rpoB1404Awt	rpoB1401Cwt	rpoB1395Cwt	neg Hyb
6	tetL2	T	C	G	T	T	G	G	G	pos Hyb
7	tetL3	G	T	T	G	G	T	T	A	neg Hyb
8	SpKontrolle	A	G	C	A	C	C	A	T	SpKontrolle
		RIF8	RIF7	RIF6	RIF5	RIF4	RIF3	RIF2	RIF1	

Abb. 2.5: „BaRes“-Spottingplan. Derselbe Block wurde viermal gespotet, um Quadruplikate zu erhalten

Das in Abbildung 2.5 dargestellte Spottinglayout wurde viermal auf einer Fläche von 20x20mm aufgebracht (Abb. 2.4), um räumlich voneinander getrennte Quadrupikate zu erhalten. Alternativ ist das Layout auch in Anhang A 3 dargestellt.

### „YpRes“ - *Yersinia pestis* -Resistenzchip

Das Layout aus Abbildung 2.6 wurde für diesen Microarray sechsmal als räumlich voneinander getrennte Hexa-Replikate auf einer Fläche von 20x20mm aufgebracht. Alternativ ist das Layout des Microarrays auch in Anhang A 4 dargestellt.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	gyrA 219 G	gyrA 259 G	gyrA 260 G	gyrA 262 G	gyrA 266 G	gyrA 267 C	gyrA 268 G	gyrA 277 G	gyrA 335 G	tet(ABCD)	ant2-IIa	pos
2	T	T	A	A	T	G	C	A	C	ant3-Ia	aac3-Ia	Puffer
3	A	C	T	T	A	A	T	T	T	aph3-Ib	aac3-IIa	Puffer
4	C	A	C	C	C	T	A	C	A	aph6-Ic	aac3-IVa	pos

Abb. 2.6: „YpRes“-Spottingplan. Derselbe Block wurde sechsmal gespottet, um Hexa-Replikate zu erhalten

## 2.11 Hybridisierung auf dem Microarray

### 2.11.1 Prähybridisierung

Die Prähybridisierung wird zur Verminderung der Hintergrundfluoreszenz durchgeführt. Dabei wird der Objektträger in unserem Fall mit Rinderserumalbumin (BSA) beschichtet. Das zu hybridisierende Produkt kann somit nicht mehr unspezifisch an den Glasobjektträger binden.

#### Lösungen:

- SSC (Natrium - Natrium-Citrat) 20x
- BSA (Rinder-Serum-Albumin)10%
- ddH<sub>2</sub>O
- SDS (Natrium-Dodecylsulfat)-Lsg 10%
- Isopropanol 100%ig

Tab. 2.11: Prähybridisierungsansatz

Reagenz	Menge ( $\mu$ l)	Endkonzentration
SSC 20x	12,5	5x
BSA 10%	5	1%
SDS 10%	0,05	0,01%
H <sub>2</sub> O	32,5	

**Durchführung:** Der gespottete Array wurde für 30 Minuten bei 33°C im Prähybridisierungspuffer inkubiert. An diesen Vorgang schlossen sich ein dreimaliger Waschschrift mit ddH<sub>2</sub>O und ein einmaliger Waschschrift mit Isopropanol an. Nach der anschließenden Trockenzentrifugation war der Array für eine Hybridisierung vorbereitet.

## 2.11.2 Hybridisierung

Während der Hybridisierungsreaktion lagert sich die Ziel-DNA an den revers komplementären DNA-Sonden an. Dazu gilt es, stringente und konstante Hybridisierungsbedingungen aufrecht zu erhalten, um eine möglichst optimale und spezifische Anlagerung zu bewirken.

### Lösungen:

- SSC (Natrium - Natrium-Citrat) 20x
- Tris-HCl 1M
- SDS (Natrium - Dodecylsulfat)-Lsg 10%
- Cy5-(markierte) DNA (bestehend aus Multiplexansätzen 1 und 2)

Tab. 2.12: Hybridisierungsansatz

Reagenz	Menge ( $\mu$ l)	Endkonzentration
SSC 20x	2,8	2,8x
Tris-HCl 1M	0,4	0,02M
SDS 10%	0,4	0,2%
Cy5-DNA Multiplex 1	11,2	
Cy5-DNA Multiplex 2	5,2	

**Durchführung:** Die Cy5-markierte DNA und die restlichen Reagenzien wurden gemäß Tabelle 2.12 vermischt und für drei Minuten bei 95°C aufgeköcht. Danach wurde diese Hybridisierungslösung auf die Spots des Microarrays pipettiert, mit einem Lifterslip bedeckt und in einer Corning Hybridisierungskammer eingeschlossen (Abb. 2.7). Um eine gesättigte Luftfeuchtigkeit in der Kammer zu gewährleisten, wurden in die vorgesehenen Reservoirs zusätzlich je 20 µl ddH<sub>2</sub>O pipettiert. Zur Hybridisierung wurde diese Kammer für 4 Stunden in ein 33°C warmes Wasserbad eingetaucht.

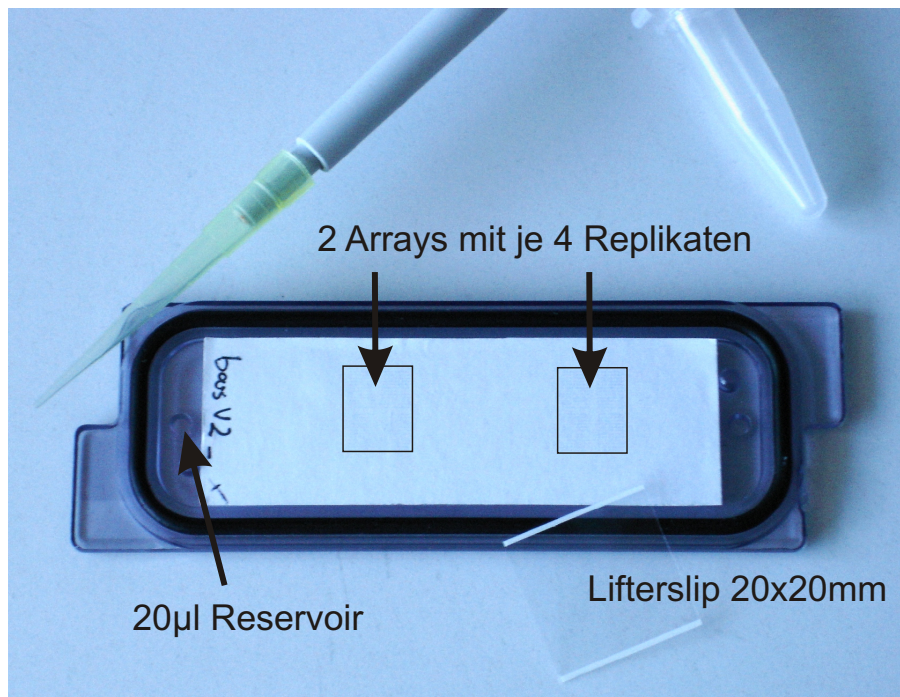


Abb. 2.7: Bild der verwendeten Hybridisierungsgeräte beispielhaft dargestellt an einem „BaRes“-Muster

### 2.11.3 Waschen

Um die während der Hybridisierung nicht angelagerten markierten DNA-Moleküle abzuwaschen, wird der Microarray in Waschpuffern mit abnehmender Salzkonzentration inkubiert.

#### Lösungen:

- Waschpuffer I

- Waschpuffer II
- Waschpuffer III

**Durchführung:** Der hybridisierte Array wurde zunächst in Waschpuffer I (5 min, RT) inkubiert. Es folgten Waschpuffer II (5 min, RT) und III (5 min, RT). Durch kräftiges Spülen mit ddH<sub>2</sub>O wurde verbliebenes SSC von der Microarrayoberfläche abgewaschen. Getrocknet wurde der Microarray durch Zentrifugation.

### 2.12 Auslesen

Die Auswertung der hybridisierten DNA-Microarrays erfolgte mit dem Chipreader Axon 4100 und der Software GenePixPro 4.1. Dabei wurde der Microarrayslide in den Scanner eingelegt und mit Laserlicht der Wellenlänge 635nm angeregt. Die Emission wurde aufgezeichnet und als Bild verarbeitet.

Nach dem Scannen der Spots wurde eine Analysesoftware gestartet, die hybridisierte Spots des Arrays erkannt und ihre Intensität gemessen hat. Anhand des Zahlenwerts der Intensität ist eine objektive Aussage über die Hybridisierung möglich. Um zu dieser zu gelangen, muss das Programm jedoch einige Rechenoperationen durchführen. Im ersten Schritt erkennt das Programm die Spots (Abb. 2.8). Damit ist die Grenze des Spots festgelegt und seine Intensität kann berechnet werden. Hierbei wird die definierte Fläche in Pixel aufgeteilt und die Intensität für jeden Pixel bestimmt.

Da in einer Hybridisierung jedoch aufgrund der verwendeten Methodik Unterschiede der Hybridisierungsbedingungen auf dem Chip zur Wirkung kommen können - beispielsweise ein unterschiedlich stark fluoreszierender Hintergrund - und dieser von der Software bei der Intensitätsbestimmung jedes einzelnen Pixels mit erfasst wird und somit in die Berechnung eingeht, muss die Hintergrundfluoreszenz von der Pixelintensität subtrahiert werden.

$$Nettointensitaet_{spot} = Intensitaet_{spot} - Intensitaet_{Hintergrund} \quad (2.3)$$

Um nun die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes zu bestimmen, definiert das Programm den Hintergrund als die Fläche (Abb. 2.11), die

- in einem Kreis mit dem dreifachen Durchmesser des jeweiligen erkannten Spots um diesen herum liegt und dabei



- nicht im erkannten Spot liegt und
- sich nicht in einem zwei Pixel breiten Ring um den eigenen oder benachbarten Spot herum befindet ([129])(Abb. 2.11)

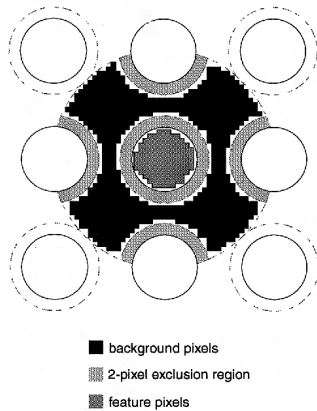


Abb. 2.8: Bestimmung des Hintergrunds eines Spots [101]

Von der Software werden nun für jeden Spot und den dazugehörigen Hintergrund jeweils die Anzahl der gewerteten Pixel ausgegeben, deren Mittelwert und Median sowie die dazugehörigen Standardabweichungen.

Dies geschieht auch mit den Hintergrund-korrigierten Intensitätswerten der Spots und den entsprechend durchgeführten statistischen Berechnungen.

Mit Hilfe dieser Werte ist es nun möglich, eine subjektive Aussage über die Stärke der Hybridisierung zu treffen. Für die weitere Auswertung wurde der Median der Nettointensität der Spotpixel verwendet.

## 2.13 Auswertung des Microarrays und Datenverwaltung

Die Art der Auswertung ist zu unterscheiden in:

1. Qualitätskontrolle Array
2. Auswertung und Qualitätskontrolle Resistenzsonden
3. Auswertung und Qualitätskontrolle SNP-Sonden sowie
4. Einbettung in die bei der Auswertung eingesetzte Softwareroutine

Dabei sind stets zwei Faktoren gleichermaßen zu beachten: Zum einen die Signalintensität, die durch das Signal-Rausch-Verhältnis ausgedrückt wird. Dieses definiert sich aus der Differenz der beim Scannen ermittelten absoluten Fluoreszenzintensität eines Spots und seinem lokalen Hintergrund, dividiert durch die Standardabweichung der absoluten Intensität des lokalen Hintergrundes. Der Wert des Signal-

Rausch-Verhältnisses wird bereits von der Software GenePixPro berechnet ausgegeben. Zum anderen muss die relative Intensität einer Sonde berechnet werden, bei der die absolute Fluoreszenzintensität der Sonde durch Vergleichswerte einer spezifischen Sonde dividiert wird.

Diese beiden Werte werden automatisch bei der Auswertung für jede Sonde durchgeführt, wobei die jeweiligen Vergleichswerte zur Bestimmung dieser relativen Intensitäten sondenspezifisch variieren.

Zusätzlich dazu werden die erhaltenen Werte der einzelnen Replikate gemittelt, sodass später die Daten sowohl für jeden Block separat ausgewertet vorliegen, als auch über den Gesamt-Array gemittelt.

Die Auswerteroutine eines Microarrayexperimentes verläuft wie nachfolgend beschrieben:

Ein Array wird dann ausgewertet, wenn alle Hybridisierungskontrollen ein Signal-Rausch-Verhältnis von größer gleich 3 aufweisen und die relativierte Intensität aller Negativkontrollen bezogen auf die Positivkontrollen nicht größer als 0,3 ist.

$$Signal - Rausch - Verhaeltnis_{pos.Hybkontrolle} \geq 3 \quad (2.4)$$

$$rel.Intensitaet_{neg.Hybkontrolle} < 0,3 \quad (2.5)$$

Sind diese Bedingungen erfüllt, so werden die restlichen Sonden ausgewertet. Dabei muss unterschieden werden zwischen Resistenzgensonden und Sonden zur Untersuchung einer bestimmten Nukleotidposition.

Die Auswertebedingungen für Resistenzgensonden beschreibt sich wie folgt:

Resistenzgensonden gelten dann als positiv, wenn sie ein Signal-Rausch-Verhältnis von größer gleich 3 besitzen und zusätzlich eine relative Intensität bezogen auf die positive Hybridisierungskontrolle von größer gleich 1 vorliegt.

$$Signal - Rausch - Verhaeltnis_{Resistenzgensonden} \geq 3 \quad (2.6)$$

$$rel.Intensitaet_{Resistenzgensonden} \geq 1 \quad (2.7)$$

Die Sonden zur Untersuchung einer bestimmten Nukleotidposition werden innerhalb von Probensätzen ausgewertet, welche aus vier Sonden bestehen, die sich nur in einem Nukleotid in möglichst zentraler Position unterscheiden.

Bevor die SONDENSÄTZE ausgewertet werden können, müssen zuvor die 4 Sonden eines SONDENSATZES miteinander verglichen werden. Die Sonde mit der höch-

ten absoluten Intensität wird als Perfect-Match-Sonde angesehen, bei der eine perfekt passende, revers komplementäre, gebundene DNA-Sequenz vorausgesetzt wird. Die verbleibenden zu derselben polymorphen Stelle gehörigen Sonden, werden als Mismatch-Sonden bezeichnet.

Im weiteren Verlauf wird nun die relativierte Intensität aller Sonden eines Sondenatzes in Bezug zu der Perfect-Match-Sonde (PM) durch Division berechnet.

$$rel.Intensitaet_{Sonde} = absoluteIntensitaet_{Sonde} / absoluteIntensitaet_{PM-Sonde} \quad (2.8)$$

Somit besitzt eine Perfect-Match-Sonde eine Intensität von 1, die Mismatch-Sonden eine Intensität von kleiner 1.

Es schließt sich nun die Auswertung an:

Eine bestimmte Nukleotid-Position gilt dann als auswertbar, wenn die Perfect-Match-Sonde mindestens ein Signal-Rausch-Verhältnis von größer gleich 3 aufweist. Zusätzlich wurde durch das Sondendesign versucht, eine maximale relativierte Intensität der Mismatch-Sonden von 0,5 nicht zu überschreiten.

$$Signal - Rausch - Verhaeltnis_{Perfect-Match-Sonde} \geq 3 \quad (2.9)$$

$$rel.Intensitaet_{Mismatch-Sonde} \leq 0,5 \quad (2.10)$$

Für den späteren Verlauf wird der Einfachheit halber „relativierte Intensität“ durch den Begriff „Intensität“ ersetzt. Sollte es sich im Text um absolute Fluoreszenzintensitäten handeln, so wird dies speziell erwähnt werden.

Die eben erläuterte Routine wurde in eine selbstentwickelte Datenbanksoftware integriert, um aufgrund der Menge anfallender Daten pro Hybridisierung Erleichterung in der Arbeit, in der Auswertung und in der Datenverwaltung zu erhalten.

Eine „Microarraydatenbank“ soll als Datenmanagement für diagnostische Microarrays entwickelt werden und muss nicht zur Auswertung und zum Vergleich von Genexpressionsarrays dienen. Ihre Aufgabe soll es sein, die zu einem Hybridisierungsexperiment gehörenden Daten zu verwalten und gleichzeitig zu ermöglichen, eine auf MSExcel basierende Auswertung halbautomatisch durchzuführen.

Zur Anwendung dieser Datenbank sind folgende Programme nötig:

- Windows XP

- MSE<sub>excel</sub>2000
- MSA<sub>access</sub>2000

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung isolierter Mutanten

#### 3.1.1 Ciprofloxacin-resistente Mutanten

##### **Bacillus cereus**

13 voneinander abstammende Mutanten wurden auf Ciprofloxacin-haltigem Medium isoliert (Tab. 3.1). Die vorhandenen Mutationen sind spontan entstanden und wurden phänotypisch und genotypisch hinsichtlich ihrer Resistenz untersucht. Durch dreimaliges Überimpfen auf Nicht-Ciprofloxacin-haltigem Medium und anschließender erneuter Anzucht auf Ciprofloxacin-haltigem Agar wurden die Mutationen auf ihre Stabilität hin untersucht und bestätigt.

Tab. 3.1: Charakterisierung der CIP- resistenten *Bacillus*-Mutanten

Name	Anzahl	MHK-Wert	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
wt	1	0,125	-	-	-	-
Ba-Cip1	11	4	C254 T	-	-	-
Ba-Cip2	3	>64	C254 T	-	G253 A	-
Ba-Cip3	4	>64	C254 T	-	C242 T	-

Bereits in der ersten Generation konnten in Isolaten erste Mutationen in *gyrA*(C254-T) nachgewiesen werden. In der zweiten Generation entstanden dann unabhängig voneinander die Mutationen *parC*G253-A und *parC*C242-T. Diese Mutationen traten zusammen mit einer Steigerung des MHK-Wertes im Phänotyp auf. In der dritten Generation der isolierten Mutanten konnte eine weitere MHK-Wert Erhöhung auf über 128 $\mu$ g/ml bei manchen Isolaten ohne eine zusätzliche beobachtete Mutation festgestellt werden.

Alle aufgetretenen Mutationen und Phänotypen wurden bereits von Price und

Bast beschrieben und stimmen auch hinsichtlich des Phänotyps voll mit ihnen überein [11, 115]. Es wurden keine Mutationen in *gyrB* oder *parE* beobachtet.

### ***Yersinia pseudotuberculosis***

Analog zu den CIP-resistenten *Bacillus*-Mutanten wurden auch die Mutanten von *Yersinia pseudotuberculosis* isoliert. Da jedoch nur für *Y. pestis* und *Y. enterocolitica* genotypische Untersuchungen des Gens *gyrA* in der Literatur zu finden waren [128, 79, 91, 32], wurde hier eine größere Anzahl an Mutanten selektiert, auf Stabilität hin geprüft und schließlich geno- und phänotypisch untersucht. Da laut Literatur die ersten Aminosäuren verändernden Mutationen im Gen *gyrA* [78, 79, 91] auftreten und diese bereits ausreichen, einen Anstieg des MHK-Wertes auf einen klinisch relevanten Wert zu bewirken, wurde sich darauf beschränkt, von den isolierten 166 Mutanten nur dieses Gen zu amplifizieren. Da die Sequenzierung aller Mutanten nicht auf einmal stattfand, sondern in Paketen, wurde aus Kostengründen darauf verzichtet, die letzten 44 Mutanten zu sequenzieren und stattdessen mit den erhaltenen Ergebnissen von 122 *in vitro* selektierten Mutanten zu arbeiten. Tabelle 3.2 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen.

Tab. 3.2: Charakterisierung der sequenzierten CIP- resistenten *Yersinia*-Mutanten

Name	Anzahl	MHK-Wert	Mutation <i>gyrA</i>	
			Aminosäure	Nukleotid
wt	1	0,125	-	-
Yp-Cip1	59	1	Gly81 - Asp	G242 - A
Yp-Cip2	2	0,25	Asp82 - Asn	G244 - A
Yp-Cip3	15	0,5	Ser83 - Ile	G248 - T
Yp-Cip4	34	1	Asp87 - Asn	G259 - A

Alle Mutationen wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal bei *Yersinia pseudotuberculosis* beschrieben. Aufgrund der Tatsache dass die gleichen Mutationen bereits bei *Yersinia pestis* und *Yersinia enterocolitica* aufgetreten sind, wurde darauf verzichtet, die bedingende Natur des Genotypen der Mutanten Yp-Cip1, Yp-Cip3 und Yp-Cip4 auf deren Phänotypen hin zu verifizieren. Abbildung 3.1 zeigt die Lage der Mutationen im sequenzierten Gen.



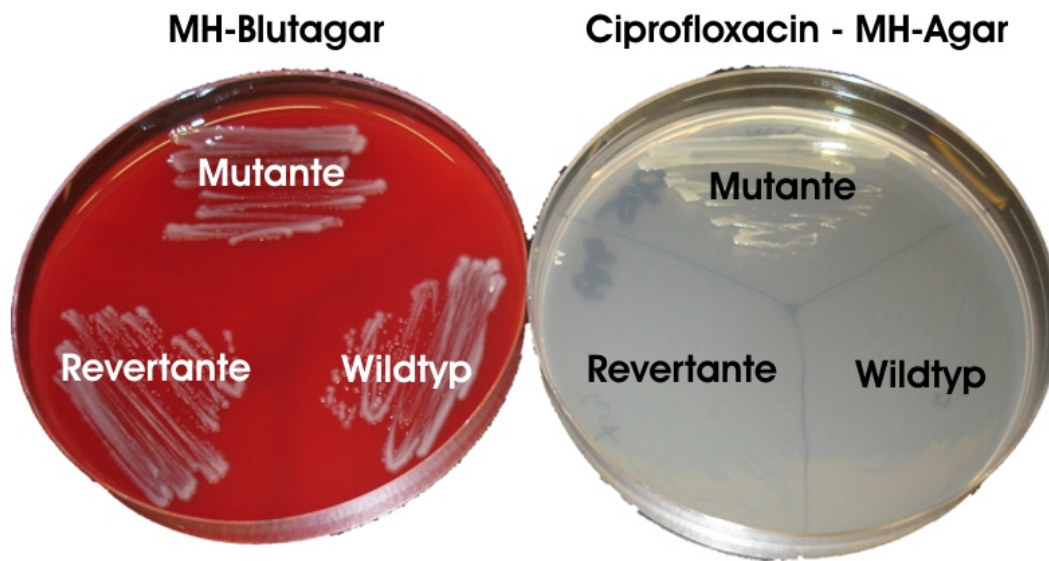


Abb. 3.2: Photo des Wildtyps, der Mutante und Revertante auf MH-Blutagar und Ciprofloxacin-MH-Agar. Auf dem Blutagar wachsen alle drei Isolate, auf dem Ciprofloxacin-haltigen Agar nur die Mutante

### 3.1.2 Rifampicin-resistente Mutanten

Insgesamt wurden 36 Rifampicin-resistente Mutanten isoliert (Tab. 3.3). Alle Mutanten wurden UV-induziert und beruhen auf jeweils einzelnen Mutationen in *rpoB*. Sie wurden alle hinsichtlich ihres MHK-Wertes untersucht und zur genotypischen Untersuchung wurde ein spezieller Abschnitt des *rpoB*-Gens amplifiziert und sequenziert. Jeder Phänotyp trat parallel mit einer Mutation in einer der variablen Positionen des untersuchten Gens auf. Alle Mutanten wurden hinsichtlich ihrer Stabilität überprüft. Dazu wurden die Mutanten dreimal hintereinander auf Nicht-Antibiotika-haltigem Medium angezogen und danach erneut auf Antibiotika-freiem Agar angezüchtet.

Mit fast 80% bewirken mehr als zwei Drittel aller aufgetretenen Mutationen einen Austausch der Aminosäure Histidin 467. Bis auf die Mutation *rpoBC1459A* sind alle Mutationen bereits von Vogler *et al.* beschrieben worden [154]. Auch die Höhe der dort beschriebenen MHK-Werte stimmt mit den bei dieser Arbeit erhaltenen Werten überein. Die fünf beschriebenen Mutationen bewirken Aminosäureaustausche in drei unterschiedlichen Aminosäuren, welche direkt mit der DNA interagieren.

Neu entdeckt und noch nie zuvor in *Bacillus spec.* beschrieben ist die aufgetretene



Tab. 3.3: Übersicht über die erhaltenen Rifampicin-resistenten Mutanten von *B. cereus* und Häufigkeit des Auftretens

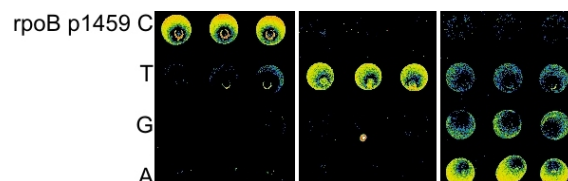
Position und Austausch <i>rpoB</i>	Häufigkeit des Auftretens (%)	MHK ( $\mu\text{g/ml}$ )
RpoB		
wildtyp (-)	wildtyp (-)	-
A1404 - G	A454 - R	5,74
C1443 - T	H467 - Y	57,14
A1444 - G	H467 - R	22,85
C1459 - T	S472 - F	11,42
C1459 - A	S472 - Y	2,85

Mutation *rpoBC*1459-A. Sie verursacht einen Aminosäureaustausch in Position 472, wo in dem codierten Protein der Mutante Tyrosin an Stelle von Serin eingebaut ist. Beobachtet wurde diese Mutation jedoch bereits in *E.coli* und *M. tuberculosis*. Abbildung 3.3 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz im Vergleich zum Wildtyp und zu der bereits beschriebenen Mutante *rpoB* C1459T [154]. Abbildung 3.4 zeigt die unterschiedlichen Hybridisierungssignale auf einem Micoarray für die Position *rpoB* 1459 im Vergleich zueinander.

wildtyp	AGTTAACTCACAACCGAAGATTATCTGCATTAGGACCTGGTGGTTTAAACGC
Mut_C1459T	AGTTAACTCACAACCGAAGATTATTTGCATTAGGACCTGGTGGTTTAAACGC
Mut_C1459A	AGTTAACTCACAACCGAAGATTATATGCATTAGGACCTGGTGGTTTAAACGC

wildtyp	LSQFMDQTNFLAELTHKSLALGFGGLTTERAGFEVVDVHYSHYG
Mut_C1459T	LSQFMDQTNFLAELTHKSLFALGFGGLTTERAGFEVVDVHYSHYG
Mut_C1459A	LSQFMDQTNFLAELTHKSLYALGFGGLTTERAGFEVVDVHYSHYG

Abb. 3.3: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen zwischen *B. cereus* Wildtyp und zwei Varianten mit Mutationen in nt-Position *rpoB*1459 bzw. aa-Position *rpoB*472. Die Positionen sind mit einem Stern gekennzeichnet.Abb. 3.4: Hybridisierungsbild der Sonden *rpoB*1459. Von links nach rechts: wt, Mut-*rpoB*-C1459T, Mut-*rpoB*-C1459A

Der MHK-Wert dieser Mutante beträgt  $800\mu\text{g/ml}$ . Auch diese Mutation war stabil. Zur Bestätigung der Abhängigkeit der gefundenen Mutation mit dem aufgetretenen Phänotypen wurde die von dieser Rif-resistenten Mutante abstammende Rif-sensible Revertante gesucht. Dazu wurde die Mutante auf IsoSensiTest-Agar und 0,5xIsoSensiTest-Agar ausgestrichen und anbebrütet. Sobald „pin-point“-Kolonien zu erkennen waren, wurden diese Klone isoliert und hinsichtlich ihrer Rifampicin-Sensibilität untersucht. Es wurde eine Rifampicin-sensible Revertante gefunden (Abb. 3.5). Ihr Phänotyp wurde bestimmt und es fand eine anschließende Sequenzierung des *rpoB*-Gens statt. Die Revertante stimmte auch hier mit dem Wildtyp überein. Damit konnte gezeigt werden, dass die neu beschriebene Mutation im *rpoB*-Gen eine Abhängigkeit im Phänotyp bei der Rifampicin-Sensibilität induziert.

Die erhaltene Sequenz wurde öffentlich gemacht bei GenBank unter der Accession-Nummer DQ832068.

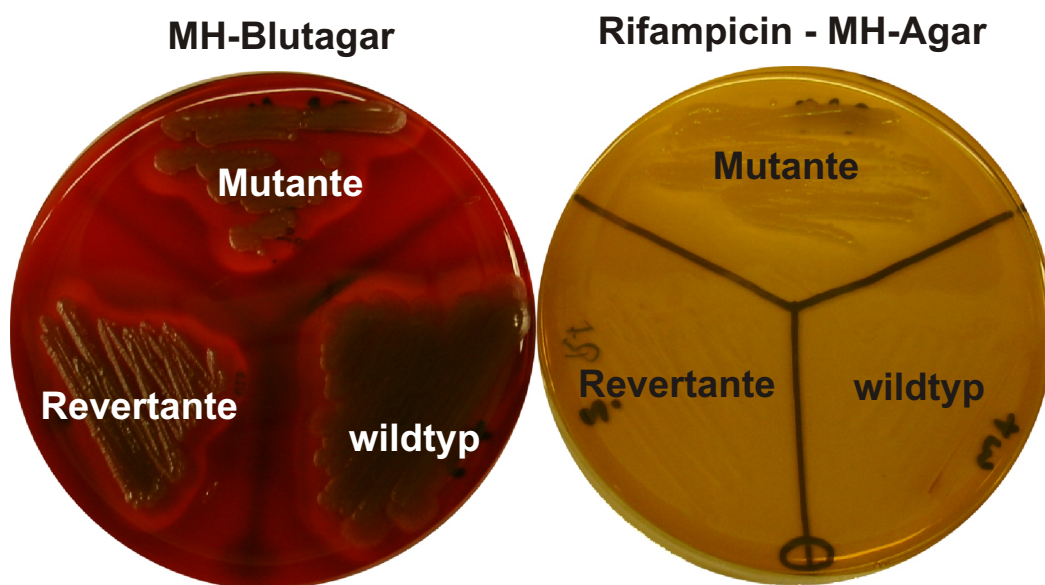


Abb. 3.5: Foto des Wildtyp, der Mutante und Revertante auf MH-Blutagar und Rifampicin-MH-Agar. Auf dem Blutagar wachsen alle drei Isolate, auf dem Rifampicin-haltigen Agar nur die Mutante

Ebenfalls zum ersten Mal beschrieben in *B. cereus* wurde in dieser Arbeit die

Mutation *rpoB* C1443T. Ihr Auftreten ist bereits in *B. anthracis* und *B. subtilis* beobachtet worden. Aus diesem Grund wurde auf den Beweis der Abhängigkeit des Genotypen mit dem Phänotypen bei dieser Mutante verzichtet, zumal keine weitere Mutation der DNA-Sequenz im untersuchten Bereich zu beobachten war.

### 3.1.3 Streptomycin-resistente Mutanten

Zusätzlich für eventuell später zu bearbeitende Arbeiten wurden zehn spontane Streptomycin-resistente *Yersinia pseudotuberculosis*-Mutanten isoliert, sowie phänotypisch und genotypisch charakterisiert. Dabei wurden folgende zwei Mutationen festgestellt (Tab. 3.4):

Tab. 3.4: Charakterisierung der Streptomycin-resistenten Mutanten von *Y. pseudotuberculosis*

lfd. Nr.	Position und Austausch		Häufigkeit des Auftretens (%)
	Nukleotid	Aminosäure	
1	A429 - C	K42 - E	75
2	A430 - G	K42 - R	25

Beide Mutationen wurden bereits bei *E. coli* beschrieben und vermitteln eine Resistenz gegen Streptomycin. Eine Abhängigkeit zu Streptomycin konnte nicht festgestellt werden, stattdessen jedoch ein merklich langsames Wachstum gegenüber dem Wildtyp. Weitere Mutationen traten bei der gewonnenen Anzahl von Mutanten nicht auf.

### 3.1.4 Transformation von *Yersinia*

Um für die späteren Versuche zur Evaluierung der Resistenzgen sonden des entwickelten Microarrays „YpRes“ jeweils gleiche Bedingungen von Seiten des Ausgangsmaterials zu erhalten, wurden die von Prof. Piepersberg erhaltenen Plasmide pHP45 und pGM160 in *Yersinia pseudotuberculosis* transformiert. Als Wirtsorganismus wurde die Mutante Yp-Cip2 gewählt, welche bereits eine Resistenz gegen Ciprofloxacin besitzt. Da es sich bei diesen beiden Plasmiden um Shuttle-Vektoren zwischen *Streptomyces* spp. und *E. coli* handelt, wurde für den Fall des Versagens zugleich die Transformation der Plasmide in *E. coli* DH5 $\alpha$  durchgeführt.

Unter Anwendung der im Material- und Methodenteil vorhandenen Einstellungen konnte eine Transformation erfolgreich durchgeführt werden. Tabellen 3.5 und 3.6 zeigen die Werte der erhaltenen Transformanten. Da das Ziel des Versuches war, nur einen transformierten Organismus zu erhalten, wurde im Versuchsaufbau darauf verzichtet, eine Transformationsrate zu bestimmen. Die erhaltenen Transformanten wurden isoliert und eine Auswahl wurde genotypisch durch Amplifizierung und Sequenzierung des transformierten Gens untersucht. Abbildung 3.6 zeigt die Auswertung einer solchen PCR, Tabellen 3.5 und 3.6 eine Übersicht über die Anzahl der erhaltenen Transformanten-Kolonien.

Tab. 3.5: Übersicht über das Transformationsergebnis bei *Y. pseudotuberculosis* Mut82

Spezies	Plasmid	DNA-Einsatz ( $\mu$ l)	Inokulum Platte ( $\mu$ l)	Anzahl erhaltener Kolonien
<i>Y.pseudo-tuberculosis</i> Cip2	(-)	-	20	
	(-)	-	80	
	pHP45	0,5	20	0
	pHP45	0,5	80	10
	pHP45	1	20	12
	pHP45	1	80	35
	pGM160	0,5	20	8
	pGM160	0,5	80	28
	pGM160	1	20	23
	pGM160	1	80	67

Tab. 3.6: Übersicht über das Transformationsergebnis *E. coli* DH5 $\alpha$  . (R = Bakterienrasen)

Spezies	Plasmid	DNA-Einsatz ( $\mu$ l)	Inokulum Platte ( $\mu$ l)	Anzahl erhaltener Kolonien
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	(-)	-	20	
	(-)	-	80	
	pHP45	0,5	20	29
	pHP45	0,5	80	>300
	pHP45	1	20	38
	pHP45	1	80	R
	pGM160	0,5	20	12
	pGM160	0,5	80	>300
	pGM160	1	20	25
	pGM160	1	80	R

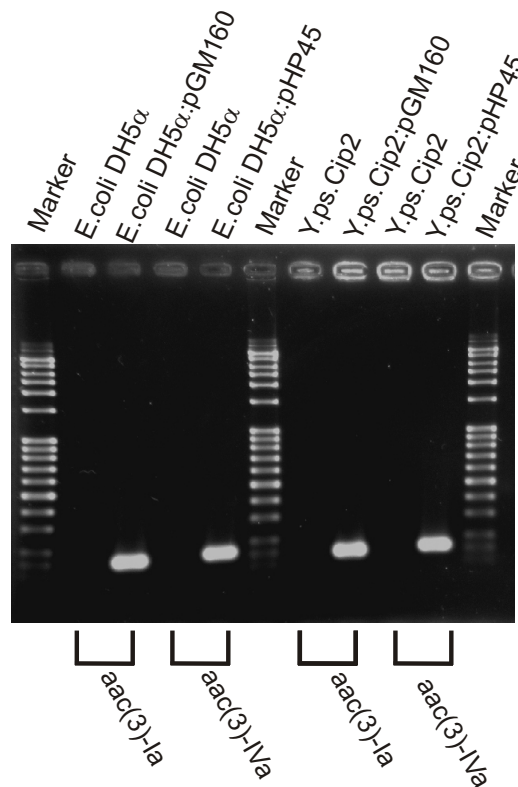


Abb. 3.6: Ergebnis der genotypischen Untersuchung, hier gezeigt am Beispiel einer PCR mit transformierten und untransformierten Zellen

## 3.2 Optimierung des Arbeitsprozesses

### 3.2.1 Multiplex-PCR

Microarrays mit kurzen Oligonukleotidsonden besitzen eine hohe Spezifität, jedoch eine niedrige Sensitivität [171]. Aus diesem Grund musste ein Amplifizierungsschritt entwickelt werden, der es ermöglicht, die nachweisbaren Genabschnitte zu amplifizieren.

Mit Hilfe der vorgestellten Multiplexansätze ist es möglich, innerhalb des Projektes „BaRes“ bis zu zehn verschiedene Genabschnitte in zwei verschiedenen Amplifizierungsreaktionen zu erhalten. Zwar wird das gleichzeitige Vorhandensein von den zehn ausgewählten Genen in einem Organismus sehr unwahrscheinlich sein, jedoch müssen 4 Genabschnitte zwangsläufig amplifiziert werden, da sie für den Organismus essentiell sind (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *rpoB*). Für das Projekt „Ypres“ ist es gelungen, eine Multiplex-PCR zu etablieren, in der bis zu acht Resistenzgene

amplifiziert werden können.

#### BaRes

Zu Beginn der Entwicklung der Multiplex-PCR wurde versucht, beide Ansätze in einer Reaktion kombiniert durchzuführen, doch stören die auftretenden Primer-Primer-Wechselwirkungen eine effektive und reproduzierbare Amplifikation.

Mit Hilfe des Computerprogrammes „Autodimer“ war es möglich, die verwendeten Primer bioinformatisch zu untersuchen, zu optimieren und letztlich die Primerpaare effektiv zusammenzustellen.

Da in einer Multiplex-PCR bevorzugt die kürzeren Amplifikationsprodukte gebildet werden, wurden die Parameter  $MgCl_2$ -Konzentration, Annealing-Temperatur, Primerkonzentration und Taq-Polymerase-Konzentration systematisch angepasst um eine gleichmäßig stabile und effektive Amplifikation aller möglicher Produkte zu erhalten.

Die Fähigkeit der Multiplex-PCR des Projektes „BaRes“ tatsächlich alle geforderten Gene der Versuchsanordnung zu amplifizieren, konnte mit einem gespikten Probenansatz gezeigt werden (Abb. 3.7). Wie dort zu erkennen, ist es durch Optimierung des Polymerasenansatzes gelungen, alle Banden in einer möglichst gleichmäßig hohen Intensität zu erhalten.

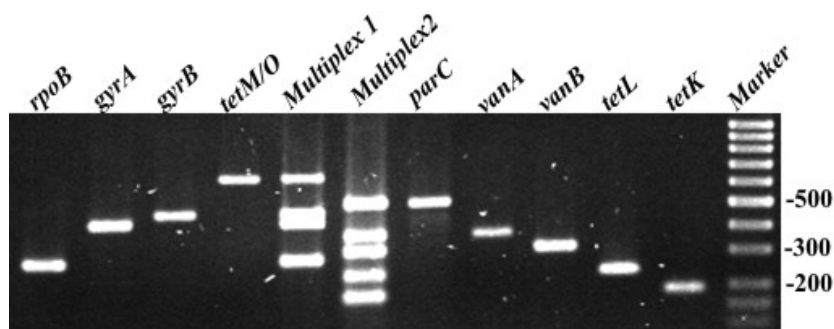


Abb. 3.7: Bild einer durchgeführten Multiplex-PCR

Um abschätzen zu können, wie robust die Multiplex-PCR in der Endanwendung ist, wurde eine Multiplex-PCR auf eine Umweltprobe angewendet. Dazu wurde getrockneter Ackerboden durch Hitze inaktiviert und auf einer Agarplatte über Nacht kultiviert. Aus dem Bakterienrasen wurde ein wenig Material in TE-Puffer verdünnt und als DNA-Template in der Multiplex-PCR eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Gene *gyrA*, *gyrB* und *parC*, sowie *rpoB* amplifiziert werden konnten. Des Weiteren

konnte eine Bande auf der erwarteten Höhe von einem möglichen *tetL*-Gen beobachtet werden (270bp) sowie in einer Höhe von 650bp eine DNA-Bande etwas unterhalb einer möglichen *tetM*-Bande auftrat. Abbildung 3.8 zeigt die dazugehörige Gelauswertung.

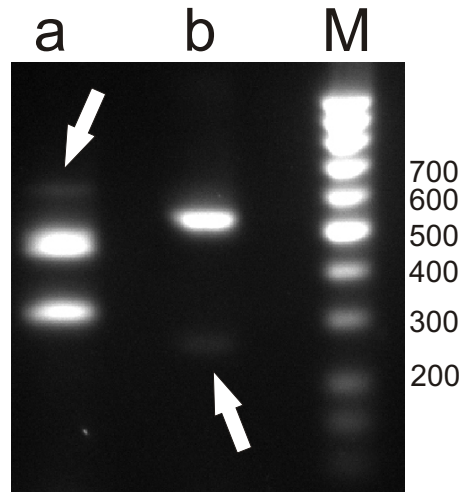


Abb. 3.8: Multiplex-PCR aus Umweltproben. Die weißen Pfeile markieren schwache Amplifikationsbanden

Aus der Bakteriensuspension, die als Einsatz für die Multiplex-PCR diente, wurden sechs morphologisch unterschiedliche Kolonien isoliert und anschließend mittels PCR genotypisch hinsichtlich aller mit der Multiplex-PCR detektierbaren Genen untersucht und die erhaltenen Amplifikate sequenziert. Zur Speziesbestimmung wurde für den Fall, dass es sich um andere Spezies als Angehörige der *Bacillus cereus*-Gruppe handelt ein taxonomisch relevanter Sequenzabschnitt der 16SrDNA amplifiziert und sequenziert. Die Kolonien wurden wie folgt charakterisiert (Tab. 3.7):

Es wurden die MHK-Werte für Tetracyclin aller Isolate bestimmt und mit 4µg/ml festgehalten, welches mit den jeweils vorhandenen *tetL*-Genen in Bezug gebracht werden kann.

Die erhaltenen *rpoB*-Sequenzen der *B. cereus*-Isolate unterschieden sich durch einige Mutationen von den in der Datenbank enthaltenen *B. cereus*-Stämmen. Dabei handelte es sich immer um stille Mutationen, welche keine Aminosäureaustausche verursachen. Unter diesen enthalten war auch ein *B. anthracis*-typischer Basenpaar-austausch *rpoBC1427A*.

Tab. 3.7: Auswertung der in der Umweltprobe nachgewiesenen Bakterien

Isolat	morphologische Besonderheit	verwendetes für Verwandtschaftsanalyse	Target	nächster wandter BLAST-Analyse	Ver- nach	vorhandene Resistenzgene	Re-
A	Normal	16SrDNA		<i>B. pumilus</i>		<i>tetL</i> (plasmid)	
B	keine Hämolyse	16SrDNA		<i>B. sphaericus</i>		<i>tetL</i> (plasmid)	
C	großer Hämolysehof	rpoB		<i>B. cereus</i>		<i>tetL</i> (plasmid)	
D	mycoide Form	rpoB		<i>B. cereus</i>		<i>tetL</i> (plasmid)	
E	kleiner Hämolysehof	rpoB		<i>B. cereus</i>		<i>tetL</i> (plasmid)	
F	diffuse Kolonie	16SrDNA		<i>B. pumilus</i>		<i>tetL</i> (plasmid)	

Durch die Sequenzierung der 16SrRNA war es möglich auch drei Organismen zu identifizieren, welche nicht der *B. cereus*-Gruppe angehören: zweimal *B. pumilus* und einmal *B. sphaericus*. Durch die getrennten PCR-Reaktionen und Sequenzierungen war es auch möglich, die mögliche „tetM“-Bande in Multiplex Ansatz 1 zu charakterisieren. Es handelt sich dabei um ein unspezifisches PCR Produkt, welches durch die rpoB-Primer bei *B. sphaericus* hervorgerufen wird. Dieses Produkt tritt reproduzierbar auf und konnte durch eine BLAST Analyse mit keiner näher beschriebenen Sequenz in Verbindung gebracht werden. Erst durch die Sequenzierung eines taxonomisch relevanten Teilstückes der 16SrDNA konnte dieser Organismus als möglicher *B. sphaericus* bestimmt werden.

## YpRes

Für das Projekt „YpRes“ wurde eine Multiplex-PCR etabliert, mit der bis zu acht Gene parallel amplifiziert werden können. Um das Problem möglicher unterschiedlicher Amplifizierungseffizienzen bestimmter Gene zu minimieren, wurden ähnliche Amplifikationsgrößen der einzelnen Gene angestrebt. Wie in Abbildung 3.9 deutlich wird, laufen die DNA-Banden in einer Größernordnung von 150 bis 300bp. Ein mögliches Multiplex-PCR-Produkt mit den vier Amplifikationsprodukten tet(D), aac(3)-IVa, aph(3'')-Ib und aph(6'')-Id, lässt sich nicht mit Hilfe einer durchgeführten Gelelektrophorese kontrollieren, zeigt jedoch im späteren Verlauf auf dem Microarray die entsprechenden korrekten Hybridisierungssignale (Abb. 3.32 ).



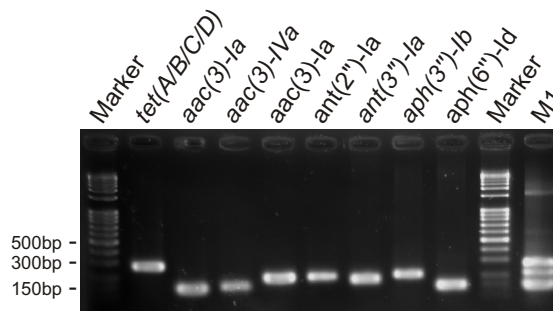


Abb. 3.9: Darstellung der nachweisbaren Gene in einer Einzel-PCR im Vergleich zu einem Größenstandard und ein erhaltenes Multiplex-PCR Produkt (M1) mit den amplifizierten Genabschnitten von *tet(D)*, *aac(3)-IVa*, *aph(3'')-Ib* und *aph(6'')-Id*

Da eine mögliche Multiplex-PCR in einem diagnostischen Labor nie ohne eine Positiv-Kontrolle durchgeführt werden sollte und als Ausgangsmaterial stets eine Kultur anzusehen ist, kann auf eine in der Multiplex-PCR eingesetzte Prozesskontrolle verzichtet werden.

### 3.2.2 Markierungsreaktion

Das bei der Multiplex-PCR erhaltene Produkt wurde aufgereinigt in der anschließenden Markierungsreaktion eingesetzt. In dieser wurden mit Hilfe des Enzyms Klenow exo-minus fluoreszierende Cy5-dUTP anstelle von dTTP eingebaut und somit ein fluoreszierender Strang komplementär zum parentalen Strang erzeugt.

In dieser Arbeit wurde sich entschieden, eine asymmetrische Markierungsreaktion vorzunehmen, um den Einbau von fluoreszierenden Molekülen in den nicht detektierbaren Strang zu verhindern. Nach Aufreinigung lassen sich die DNA-Banden des markierten Produktes in einem Gel sowohl mit einer EtBr-Färbung als auch unter einem Fluoreszenzscanner erkennen (Abb. 3.10).

Die Einbaurate von Cy5-dUTP wurde mit einem Fluoreszenzimager gemessen, um somit die Effizienz der Markierungsreaktion ermitteln zu können. Dabei wurde angelehnt an die Methode von J. deRisi [50] eine Markierung mit Hilfe der Taq-Polymerase mit der hier später verwendeten Methode des enzymatischen Markierens mit einer isothermalen Klenowreaktion verglichen (Abb 3.11).

Bei der Methode von J. deRisi handelt es sich eigentlich um eine drei-stufige PCR [50]. Bei dem hier verwendeten Ansatz wurde jedoch nur die letzte Stufe verwendet. Dabei wird mit Hilfe der Taq-Polymerase und einem Nukleotidgemisch, welches

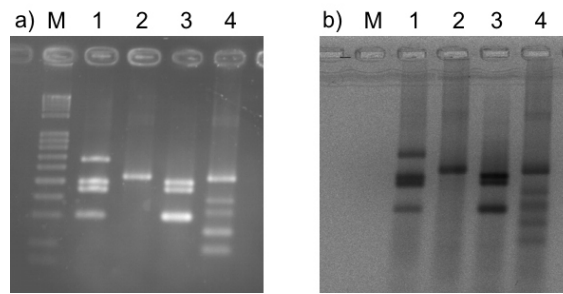


Abb. 3.10: Überprüfung des Labellings a) Agarose unter UV-Licht mit EtBr gefärbt  
b) bei 635nm im Fluorimager; M:Marker 1 und 3: 4er Mix, 2 und 4: 5er Mix

Cy5-dUTP beinhaltet, eine PCR durchgeführt, um den Einbau in die notwendigen PCR-Produkte zu erhalten.

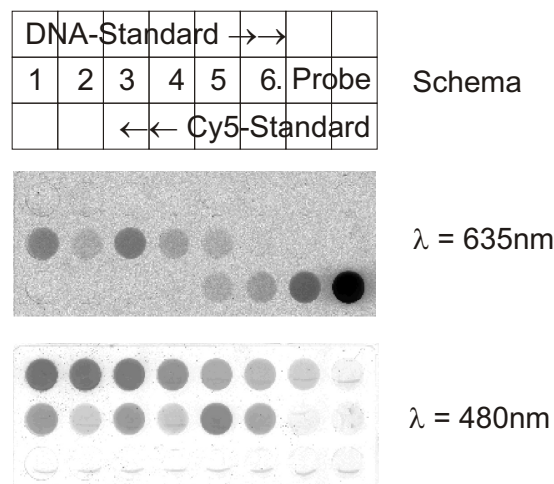


Abb. 3.11: Bestimmung der Einbaurate

Um vergleichbare Daten rechnerisch nach den Formel 2.2 - 2.5 erhalten zu können wurde sich auf das Produkt einer PCR mit den Primern *gyrA* beschränkt. Der Ansatz wurde zu gleichen Teilen aufgeteilt und von dort an getrennt weiterverarbeitet.

Da die Einbaurate eventuell durch die Primerwahl beeinflusst werden kann, wurde gleichzeitig ein weiterer Ansatz bei der Klenow Markierungsreaktion mit dem PCR-Produkt *rpoB* durchgeführt. Um nicht im Sättigungsbereich des Fluoreszenzscanners zu gelangen, wurden von jedem Ansatz die beiden Verdünnungsstufen 1:10 (V10) bzw. 1:100 (V100) mit dem Fluorimager und der Software Aida ausgewertet und im Anschluss mit den Formeln 2.2 - 2.5 bestimmt.

Tab. 3.8: Bestimmung und Vergleich der Einbaurate bei Einsatz unterschiedlicher Markierungsreaktionen. K Klenow T Taq

Nr.	Name	Enzym	Cy5dUTP	DNA-Moleküle	Einbaurate
			fmol/ $\mu$ g	fmol/ $\mu$ g	
1	gyrA V10	K	7,6	0,2	35,4
2	gyrA V100	K	1,3	0,1	34,1
3	rpoB1 V10	K	10,3	0,3	32,1
4	rpoB1 V100	K	2,0	0,1	39,0
5	gyrA V10	T	1,0	0,8	1,3
6	gyrA V100	T	0,2	0,1	1,5

Anhand von Abb.3.11 und Tab. 3.8 zeigt sich, dass mit Hilfe der Methode von J. deRisi zwar eine deutlich höhere Menge an DNA im Ansatz zur Verfügung steht (Nr. 5 und 6), diese jedoch deutlich schwächer markiert wurde. Dagegen zeigt die Klenowreaktion eine vielfach bessere Markierung bei deutlich weniger DNA (Nr. 1-4). Dies ist besser in den Zahlenwerten der Einbaurate zu erkennen. Während in der Klenowreaktion pro DNA-Molekül ca. 35 Cy5-dUTP eingebaut wurden, waren dies bei der Markierungsreaktion mit der Taq-Polymerase nur durchschnittlich 1,4 Moleküle. (Tab. 3.8)

### 3.3 Entwicklung des Microarrays „BaRes“

Für das Microarray-Modul „BaRes“ wurden 70 unterschiedliche Sonden entwickelt (Anhang A 2). 60 Sonden um mögliche Punktmutationen an insgesamt 15 verschiedenen Nukleotidpositionen innerhalb der Gene *rpoB*, *gyrA*, *gyrB* und *parC* abzufragen und zehn Sonden für die Detektion von sechs Resistenzgenen. Bei den Resistenzgenen wurden zusätzlich konservierte, redundante Sonden im Falle von *vanA* und *vanB* als auch von *tetM* und *tetO* entwickelt, um die Spezifität des Microarrays zu erhöhen. Das Gen *tetL* kann sowohl chromosomal als auch plasmidisch codiert sein. Für beide Varianten wurde jeweils eine Sonde entwickelt und zusätzlich eine redundante Sonde, mit welcher es möglich ist, beide Varianten zusammen zu detektieren.

Für die Auswahl der Sondensequenzen zur Detektion von Punktmutationen wurden die Zielsequenzen bioinformatisch untersucht und wenn möglich angepasst. Für dieses Modul wurde sich für eine Sondenlänge von 20 bis 25 Basen entschieden, um

später auch Nukleotidaustausche detektieren zu können. Die relevanten Positionen wurden durch Literaturrecherche und anhand eigener Ergebnisse ausgewählt. Für die Sondensequenzen war es wichtig, dass das abzufragende Nukleotid möglichst zentral in der Sondensequenz platziert ist, um später eine optimale Diskriminierung zu ermöglichen [150]. Zusätzlich galt es für alle Sonden, spezifisch für die zu untersuchende Position zu sein. Dies wurde mit der BLAST Suchfunktion des NCBI durchgeführt. Des Weiteren sollten die Sonden möglichst keine Sekundärstrukturen aufweisen, welches mit der „mfold“-Software überprüft wurde. Im Zuge des Evaluationsprozesses wurden empirisch einige Sonden verlängert, um annähernd gleiche Fluoreszenzsignale auf dem ganzen Array zu erhalten, sofern dies eine spätere Diskriminierung nicht störte.

Zu Beginn der Evaluierung der Sonden wurde eine Kreuzhybridisierung innerhalb des Sondensatzes *gyrA*-254 festgestellt. Bei einer Hybridisierung mit einer Mutante welche ein „A“ in der Zielsequenz an Position 254 besaß, konnte eine eindeutige Diskriminierung erfolgen. Die Zielsequenz des Wildtyp, mit dem Nukleotid „G“ an der Position 254, hybridisierte jedoch gleichermaßen an den Sonden mit dem komplementären „C“, als auch mit der Sonde mit dem Nukleotid „T“. Somit war keine eindeutige Diskriminierung mehr möglich. Aus diesem Grund wurde dieser Sondensatz weiter evaluiert, indem zusätzlich eine künstliche Mutation in die Sondensequenz eingebracht wurde. Tab. 3.9 zeigt die untersuchten Sequenzvarianten.

Im Anschluss daran wurden sowohl mit dem Wildtyp, als auch mit der Mutante hybridisiert und die beste Sondensequenz ausgewählt. In Abb. 3.13 sind die Hybridisierungsbilder dargestellt.

Nach den erhaltenen Ergebnissen wurde sich für den Sondensatz „3+“ entschieden, da dieser eine mit den Ausgangssonden (Sondensatz 1) vergleichbare und auch ausreichende Intensität aufwies bei einer gleichzeitig guten Diskriminierung (Abb. 3.12). Mit dem ausgewählten Sondensatz ist es nun möglich, sowohl für den Wildtyp, als auch für eine Mutante eine eindeutige Aussage über das vorhandene Nukleotid der Position *gyrA*254 zu erhalten.

Tab. 3.9: Übersicht über verwendete Sonden mit zusätzlicher künstlicher Mutation

Name	Sequenz (5' - 3')	Bemerkungen
Target (s)	atagtgggagtaccactaagtcgacaaatactt	markierter DNA-Strang
Sequenz (as)	tatcacccctcatgggtgattcagctgtttatgaa	Sondensequenz
1	.....ctcatgggtgattcagctgttta..... .....ctcatgggtgatttagctgttta.....	1. Version wildtyp 1. Version mutante
2	.....ctcatgggtgattcagttgttta..... .....ctcatgggtgatttagttgttta.....	
2+	.....ccctcatgggtgattcagttgtttatg... .....ccctcatgggtgatttagttgtttatg...	Sondensatz 2 + 4nt
3	.....ctcatcgtgattcagctgttta..... .....ctcatcgtgatttagctgttta.....	
3+	.....ccctcatcgtgattcagctgtttatg... .....ccctcatcgtgatttagctgtttatg...	Sondensatz 3 + 4nt
4+	.....ccctgatcgtgattcagctgtttatg... .....ccctgatcgtgatttagctgtttatg...	ähnlich Sondensatz 3+ 4nt

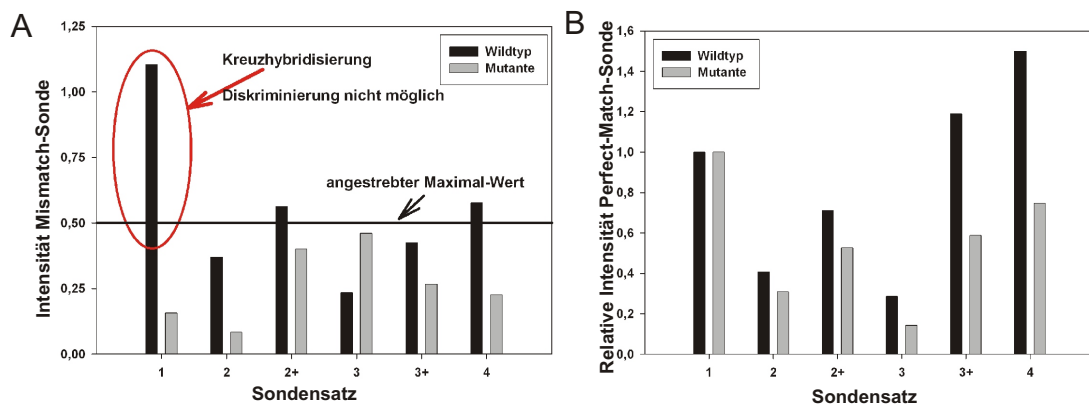


Abb. 3.12: Grafische Auswertung der Hybridisierungsbilder (Abb 3.13), Sondennamen korrespondieren mit Tabelle 3.9. A Grafische Auswertung der Intensitäten der Mismatch-Sonden zur Bestimmung der Diskriminierungsfähigkeit. Bei Sondensatz 1 ist eine starke Kreuzhybridisierung ersichtlich. B Grafische Auswertung der Signalintensität der Perfect-Match-Sonden im Vergleich zu der Signalintensität des Sondensatzes 1.

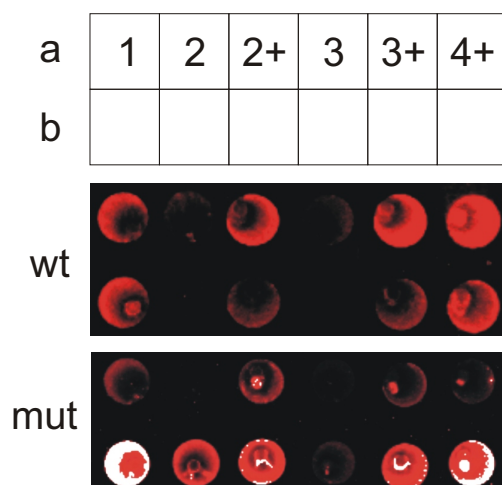


Abb. 3.13: Hybridisierungsbilder mit Sonden nach Einbringen der künstlichen Mutationen und Spottingsschema. In Reihe a ist die zum Wildtyp perfekt passende Sonde gespottet, in Reihe b die der Mutante. Sondennamen korrespondieren mit Tabelle 3.9

### 3.3.1 Detektionsfähigkeit des Arrays

Tab. 3.10 zeigt eine Übersicht über die nachweisbaren Gene sowie über die beobachteten und detektierbaren Nukleotidmutationen mit dem entwickelten Microarray Modul „BaRes“.

## 3.4 Hybridisierungsergebnisse - BaRes

### 3.4.1 Allgemein

Wie bereits im Material- und Methodenteil beschrieben, wurde jedes Replikat separat ausgewertet und das Ergebnis der vier Replikate gemittelt. Die grafische Datenaufbereitung (Abb. 3.15 - 16) baut sich wie folgt auf: Links oben sind alle vier Replikate einer Hybridisierung im Vollbild zu sehen. Rechts oben ist eine Vergrößerung des gelben Ausschnitts dargestellt. Dabei handelt es sich um einen für diese Hybridisierung relevanten Bildausschnitt eines beliebig ausgewählten Replikats. Die grafische Auswertung der Sonden sowohl für die Ciprofloxacin-Resistenz- als auch für

Tab. 3.10: Detektionspotential von „BaRes“

Nr	Gen	beobachtete Mutation (nt-Position)	Zitat
1	<i>gyrA</i>	C254 T	[115]
2	<i>gyrA</i>	G265 A	[115]
3	<i>gyrA</i>	A266 C	[115]
4	<i>gyrB</i>	G1309 A	[115]
5	<i>gyrB</i>	A1423 G	[115]
6	<i>parC</i>	A242 G	[115]
7	<i>parC</i>	G253 A	[115]
8	<i>rpoB</i>	C1395 G	[154]
8	<i>rpoB</i>	C1395 T	[154]
9	<i>rpoB</i>	C1401 G	[154]
10	<i>rpoB</i>	A1404 A	[154]
11	<i>rpoB</i>	A1404 G	[154]
12	<i>rpoB</i>	A1420 T	[154]
13	<i>rpoB</i>	C1443 T	[154]
14	<i>rpoB</i>	A1444 G	[154]
15	<i>rpoB</i>	A1444 T	[154]
16	<i>rpoB</i>	A1444 C	[154]
17	<i>rpoB</i>	A1444 A	[154]
18	<i>rpoB</i>	A1448 C	[154]
19	<i>rpoB</i>	C1459 T	[154]
20	<i>rpoB</i>	C1459 A	diese Arbeit
21	<i>rpoB</i>	Δ1400-1408	[154]
22	<i>tetK</i>		[124, 125]
23	<i>tetL</i> plasmid		M63891
24	<i>tetL</i> chromosom		[4]
25	<i>tetM</i>		[124, 125]
26	<i>tetO</i>		[124, 125]
27	<i>vanA</i>		[90]
28	<i>vanB</i>		

die Rifampicin-Resistenz-relevanten Nukleotid-Positionen (CIP- bzw. RIF-Block) sind unabhängig vom gewählten Ausschnitt in der unteren Hälfte des Bilds stets zu sehen. Dabei zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung der vier Replikate zueinander an. Soweit vorhanden, ist die für den vorliegenden Genotypen relevante Mutation besonders kenntlich gemacht (gelb umrandet) - sowohl im vergrößerten Bildausschnitt, als auch in der grafischen Auswertung des CIP- bzw. RIF-Blocks.

Der endgültige Microarray wurde mit allen vorhandenen Genotypen und detektierbaren Spezies getestet. Es handelt sich dabei um die drei wildtyp-*B. anthracis*-Stämme BA334, BA340 und BA369, *B. cereus* ATCC10987 und acht davon abstammende isolierte Mutanten, eine Revertante und der *B. cereus* wildtyp mit Misch-DNA. Die Sequenzen aller untersuchten Nukleotidpositionen konnten korrekt und eindeutig identifiziert werden. Auch Hybridisierungen mit Misch-DNA zum Testen der Resistenzgensonden konnten erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 3.17). In den folgenden Abbildungen ist eine Auswahl an Hybridisierungsbildern dargestellt.

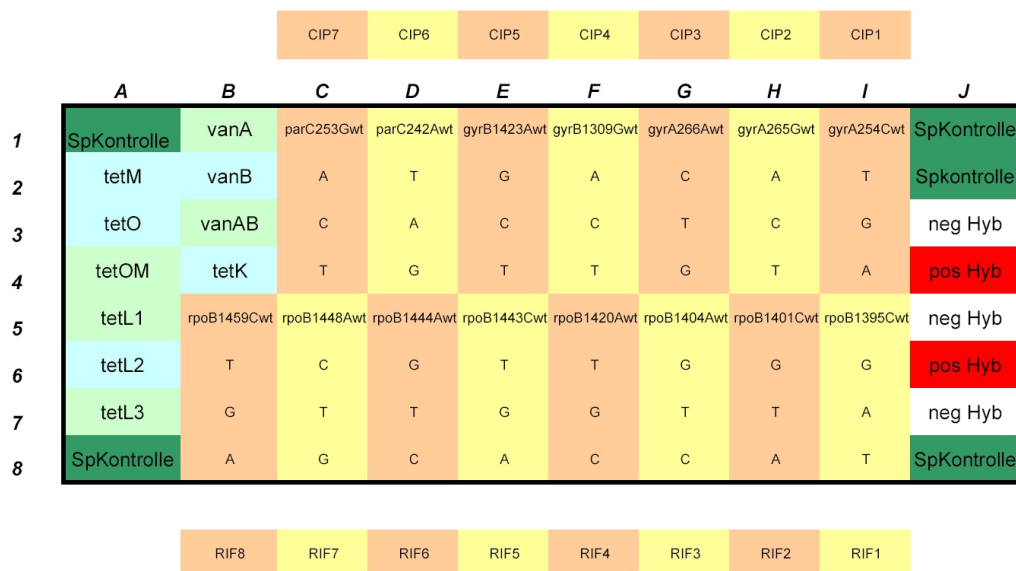


Abb. 3.14: Spottingplan. Derselbe Block wurde viermal gespottet, um Quadruplikate zu erhalten



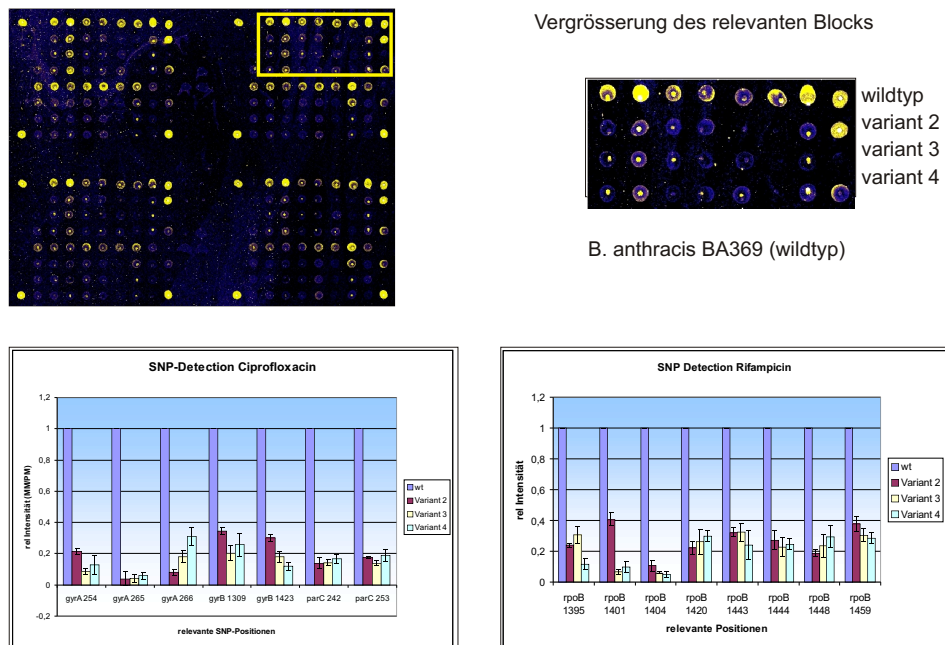


Abb. 3.15: Hybridisierung und Auswertung BA369

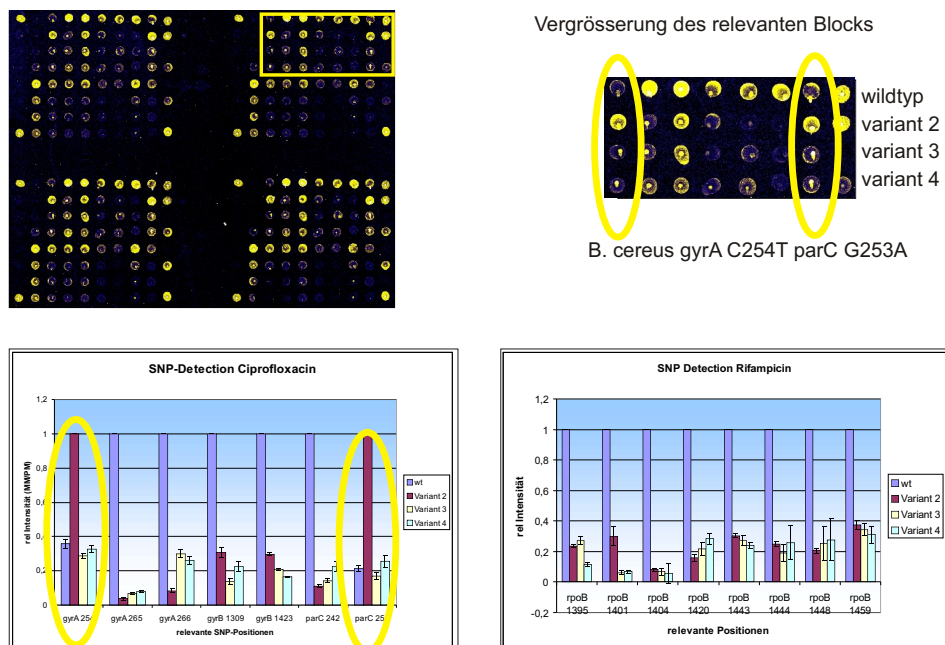


Abb. 3.16: Hybridisierung und Auswertung Mutante Cip 3

#### 3.4.2 Hybridisierungskinetik

Es wurde die Hybridisierungskinetik des Systems untersucht, um die minimal benötigte Hybridisierungsdauer festzustellen, bei der qualitativ aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Dabei liegt besonders der Augenmerk auf der Signalintensität der Perfect-Match-Sonden in Form des Signal-Rausch-Verhältnisses wie im Material und Methodenteil beschrieben, als auch auf der Diskriminierungsfähigkeit der Sonden, welche sich in den Intensitäten der Mismatch-Sonden widerspiegelt.

Um die Kinetik beider Faktoren zu ermitteln wurde ein Experiment durchgeführt, welches nur in der Hybridisierungsdauer variiert. Für die Zeitspannen wurden folgende Werte ausgewählt und hinsichtlich des Ergebnisses untersucht: 15min, 30min, 60min, 120min, 240min und 960min. Durchgeführt wurde dieser Versuch mit der Mutante, welche einen vom Wildtyp unterschiedlichen Genotypen an der Position *rpoBA1404 G* besitzt. Abb. 3.18 zeigt die Bilder der Hybridisierungen.

Um eine aussagekräftige und beständige Mindesthybridisierungsdauer zu erhalten, wurden die Ergebnisse besonders im Hinblick auf vier Qualitätsmerkmale untersucht:

- das Signal-Rausch-Verhältnis der Perfect-Match-Sonden
- die absoluten Intensitäten der Perfect-Match-Sonden
- die Intensität der Mismatch-Sonden zur Bestimmung der Diskriminierungsfähigkeit und
- die Reproduzierbarkeit der Intensität der Mismatch-Sonden innerhalb eines Slides als mögliche Kennzahl für eine homogene Verteilung markierter Moleküle.

Von der Software wurden nach der Hybridisierung alle Perfect-Match-Sonden korrekt identifiziert. Jedoch konnten nicht zu jeder Zeit in allen Bereichen die im Material und Methodenteil festgesetzten Qualitätskontrollen als positiv bezeichnet werden.

Das gemittelte Signal-Rausch Verhältnis der Perfect-Match-Sonden zeigt einen Anstieg über die Zeit (Abb. 3.19). Mit einem Wert von 2,21 bei 15min liegt das Signal-Rausch Verhältnis der Sonde *rpoB 1404* nicht oberhalb des vorher festgelegten Grenzwertes von 3 (nicht gezeigt). Erst ab 60min Hybridisierungsdauer ist dieses Qualitätsmerkmal bei allen designierten Perfect-Match-Sonden erfüllt. Deren

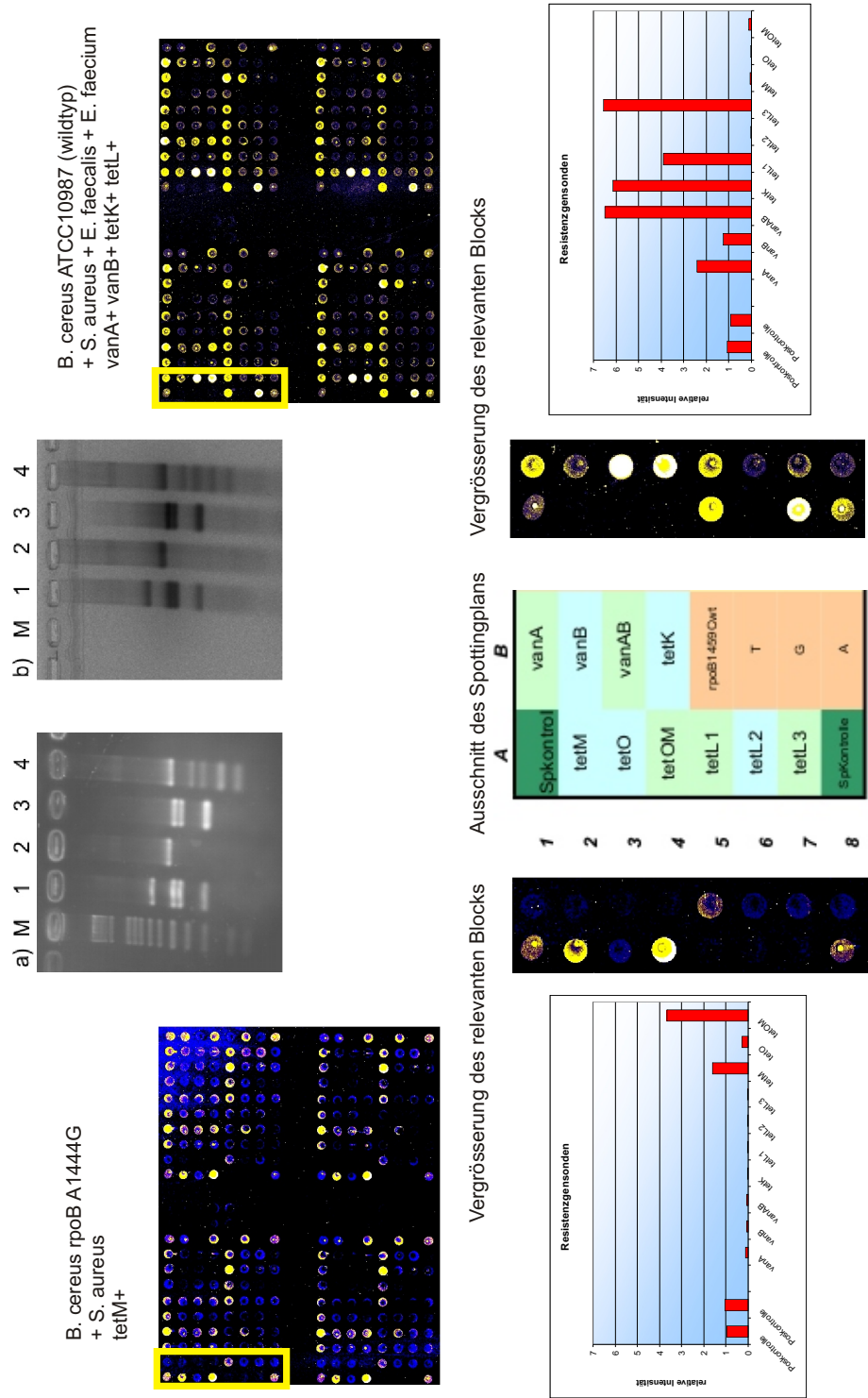


Abb. 3.17: Hybridisierung und Auswertung Resistenzgensonden bei Verwendung von Misch-DNA. Oben: EtBr-Gel (a) und Fluoreszenz-Gel (b) mit der verwendeten DNA. Linke Hälfte: Bild der Hybridisierung mit DNA der Gelspuren 1 und 2. Rechte Hälfte: Bild der Hybridisierung mit DNA der Gelspuren 3 und 4

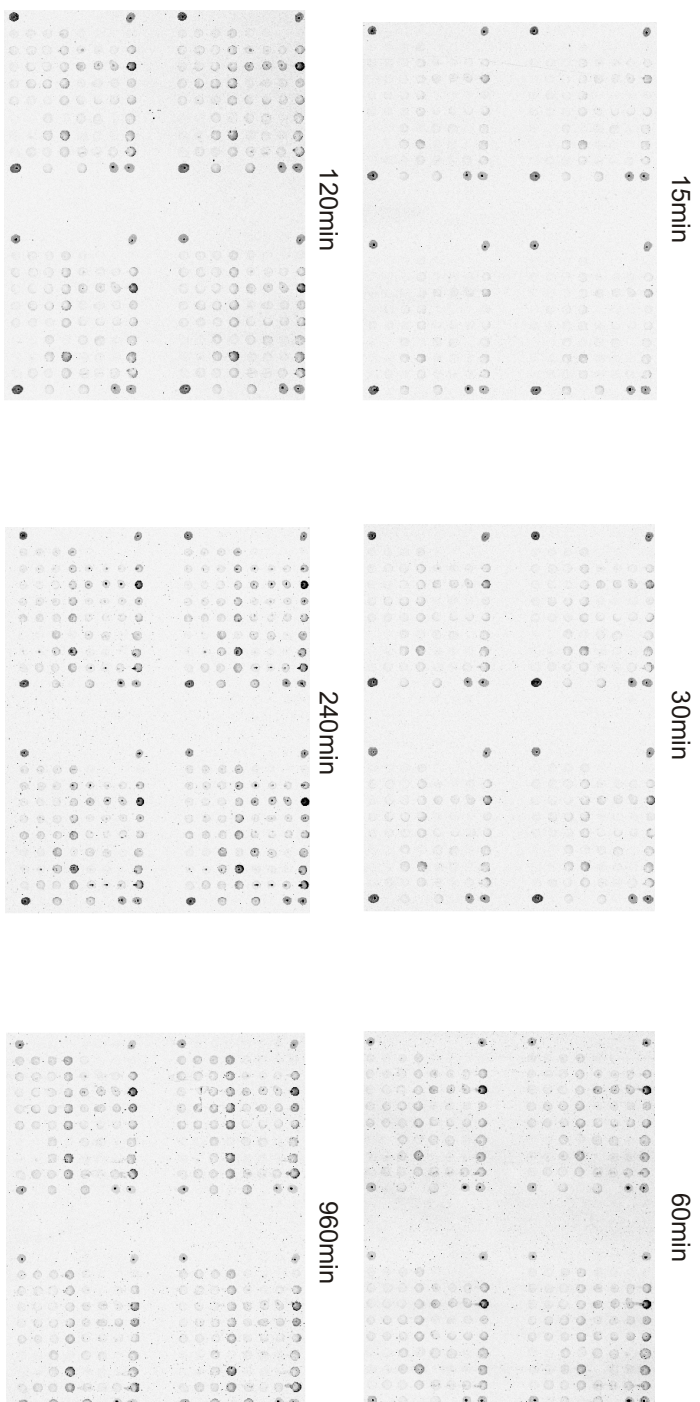


Abb. 3.18: Hybridisierungsbilder des Kinetikversuchs. Hybridisierung wurde mit der Mutante Rif4 durchgeführt

Mittelwerte zeigen eine streng monoton steigende Charakteristik, welche zunächst exponentiellen Charakters entspricht, später abflacht und schließlich in ein Plateau mündet, welches bei 240min beginnt und einem Signal-Rausch-Verhältnis von ungefähr 12 entspricht.

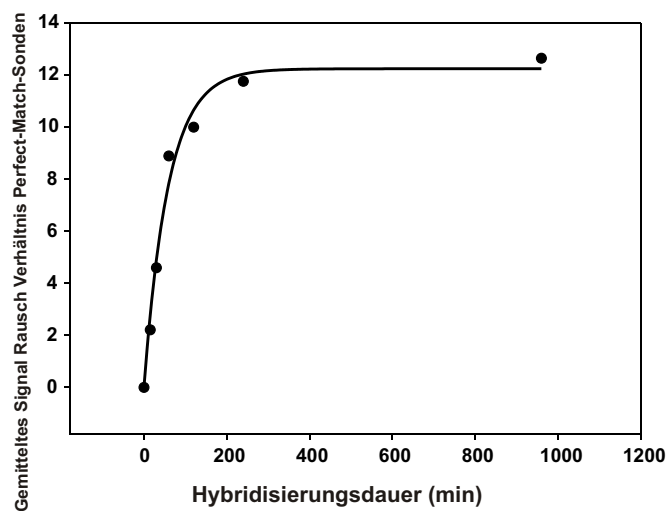


Abb. 3.19: Kinetik der Signalintensität. Grafische Darstellung der gemittelten Signal-Rausch-Verhältnisse der Perfect-Match-Sonden über die Zeit

Zusätzlich zu dem Signal-Rausch Verhältnis der Perfect-Match-Sonden wurden die absoluten Intensitäten untersucht. Dabei zeigte sich folgendes Bild (Abb 3.20 unten): Bei jeder Position ist zunächst ein Anstieg der absoluten Fluoreszenz zu erkennen, welcher je nach Sonde bis 120min oder 240min dauert. Später treten keine signifikanten Schwankungen hinsichtlich der Intensität mehr auf. Deutlicher wird dies, wenn man die gemittelten absoluten Fluoreszenzintensitäten gegen die Zeit betrachtet (Abb.3.20 oben)

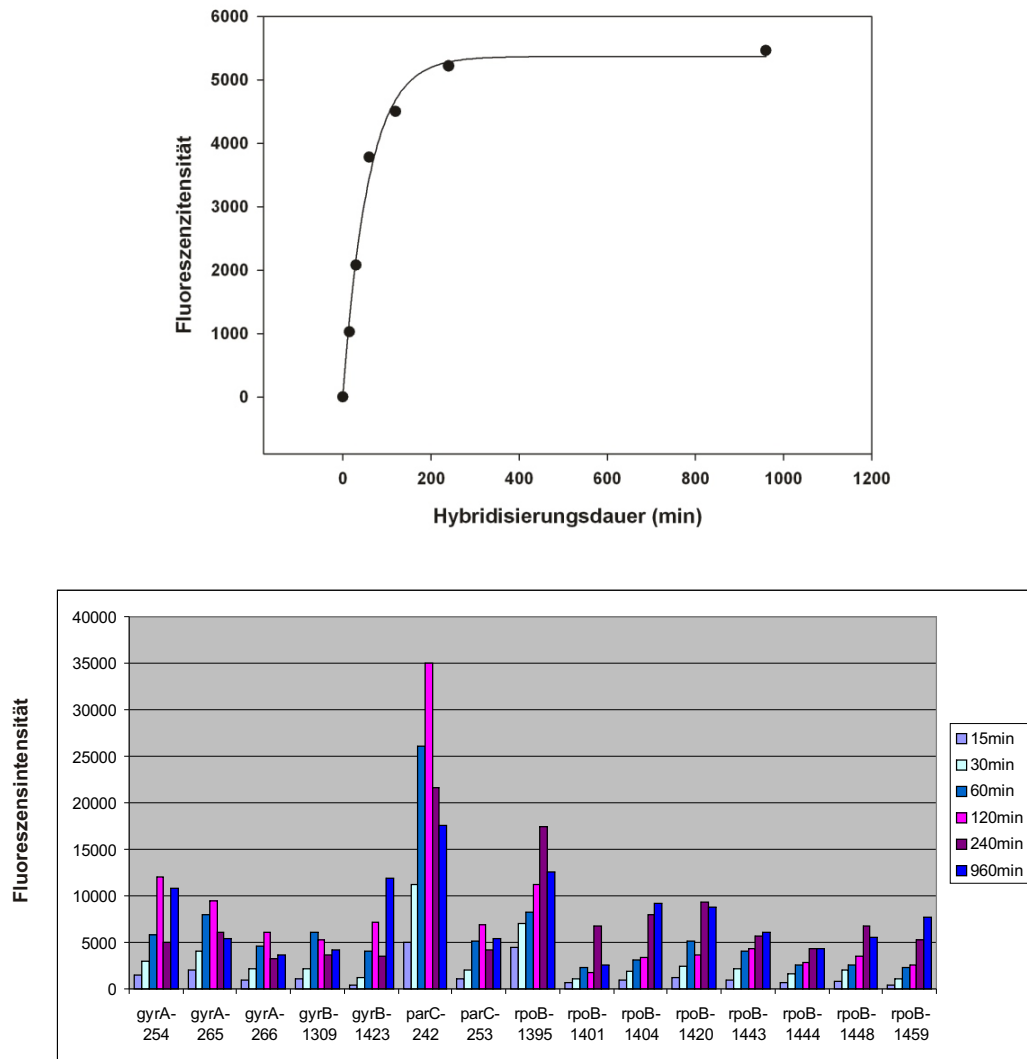


Abb. 3.20: Kinetik der absoluten Intensitäten aller Perfect-Match-Sonden aufgeschlüsselt nach der Sondensätzen

Nach Auswertung des vorhandenen Signals, sowohl durch die Betrachtung des Signal-Rausch-Verhältnis, als auch der absoluten Fluoreszenzintensitäten, kommt man zu dem Schluss, dass bereits nach 60min ein Signal-Rausch Verhältnis bei allen Sonden von größer gleich drei vorliegt und somit ein verlässliches Signal vorhanden scheint. Im weiteren Verlauf nehmen die vorhandenen Signale zu, bis dass sie ein Intensitäts-Plateau erreicht haben, welches nach einer Hybridisierungsdauer von 240min erreicht ist.

Die Fähigkeit der Diskriminierung der Sondensätze in Bezug zur Hybridisierungsdauer ist ebenfalls untersucht worden (Abb. 3.21). Dazu wurden die gemittelten In-

tensitäten der Mismatch-Sonden gegen die Zeit aufgetragen. Es zeigte sich, dass die gemittelten Intensitäten zu Beginn der Hybridisierung monoton fielen und schließlich nach 240min sich asymptotisch einem Grenzwert von 0,22 annäherten.

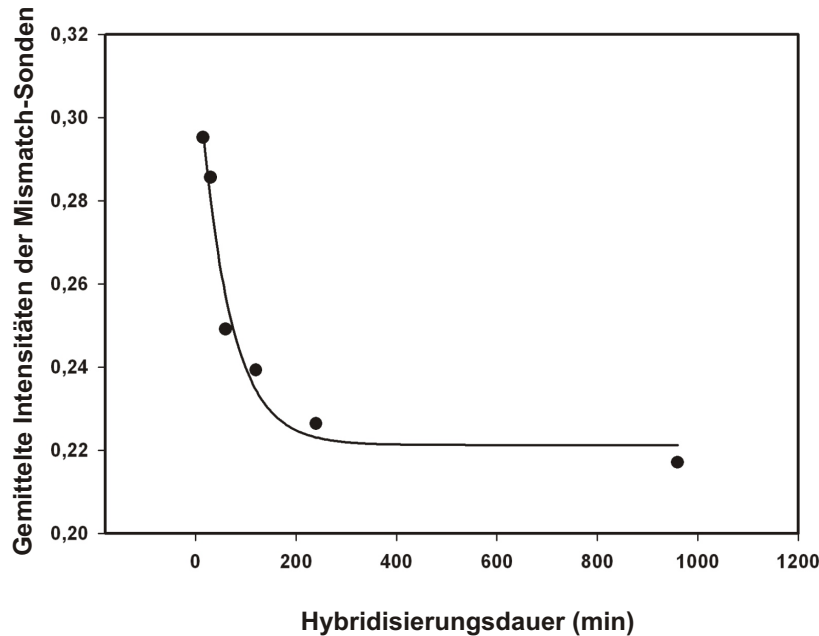


Abb. 3.21: Kinetik der Diskriminierungsfähigkeit. Garfische Darstellung der gemittelten Intensitäten der Mismatch-Sonden über die Zeit

Bei der slidespezifischen Auswertung fiel auf, dass einzelne Sonden bei den Hybridisierungen der Zeitdauer 15 (n=4) , 30 (n=2) und 60min (n=1) die angestrebte Diskriminierungsfähigkeit noch nicht erreichten, da einzelne Mismatch-Sonden eine Intensität von größer 0,5 aufwiesen. Nach einer Hybridisierungsdauer von 60 Minuten war die höchste Intensität einer Mismatch-Sonde 0,53.

Aufgrund der räumlich getrennten Quadruplikatenanordnung der Sonden auf dem Array ist es möglich, Abweichungen innerhalb eines Arrays zu bestimmen und somit abstrahierte Aussagen über eine homogene Verteilung der markierten DNA zu erhalten. Um dies zu ermöglichen, wurden die Mediane der Standardabweichungen der Intensitäten der Replikate der Mismatch-Sonden gebildet und gegen die Zeit aufgetragen. Nach 15 Minuten liegt dieser Wert bei 0,092, verläuft dann logarithmisch und nähert sich ab 240min dem Grenzwert 0,024 (Abb. 3.22). Da an den räumlich getrennten, sequenzgleichen Sonden unterschiedlich starke Signale durch gebundene, markierte DNA-Moleküle erfasst wurden, lässt sich daraus ableiten, dass zu Beginn der Hybridisierung sich noch nicht gleichmäßig im Raum verteilte Mole-

küle befanden, welche die Möglichkeit hatten, an den Sonden zu hybridisieren. Nach 240min scheint dagegen eine optimale Verteilung an markierter DNA innerhalb der 22 x 22mm großen Hybridisierungsfläche gegeben zu sein.

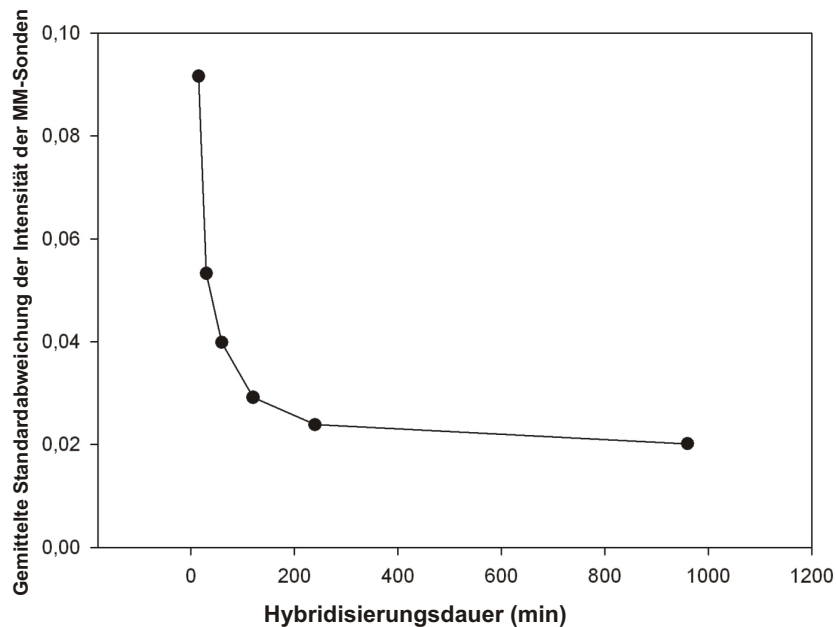


Abb. 3.22: Kinetik der Reproduzierbarkeit der Intensitäten der Replikate eines Slides. Grafische Darstellung der gemittelten Standardabweichung der Intensitäten der Replikate der Mismatch-Sonden über die Zeit

Nach Auswertung der Ergebnisse bei dieser Versuchsanordnung bezüglich des Signal-Rausch-Verhältnisses der Perfect-Match-Sonden, der Diskriminierungsfähigkeit der Mismatch-Sonden und der Reproduzierbarkeit der Intensitäten innerhalb eines Slides wurde die minimale Hybridisierungsdauer auf 60 Minuten festgelegt, da ab hier bereits ein ausreichendes Signal vorliegt (Signal-Rausch-Verhältnis größer 3) und eine eindeutige Diskriminierung zwischen Mismatch- und Perfect-Match-Sonden durchführbar ist. Im weiteren Verlauf wird das Signal der Sonden nur noch stärker, ändert aber nichts mehr an der endgültigen Aussage der Untersuchung, wenngleich sich die Diskriminierungsfähigkeit weiter verbessert.

#### 3.4.3 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde in zwei unterschiedlichen Experimenten bestimmt. Zum einen galt es die Reproduzierbarkeit der Hybridisierung und



des Waschschruttes alleine zu testen und des Weiteren die Reproduzierbarkeit des gesamten Versuchablaufs, d.h. von der Multiplex-PCR bis zur Hybridisierung und dem Waschen des Microarrays (Abb. 3.23).

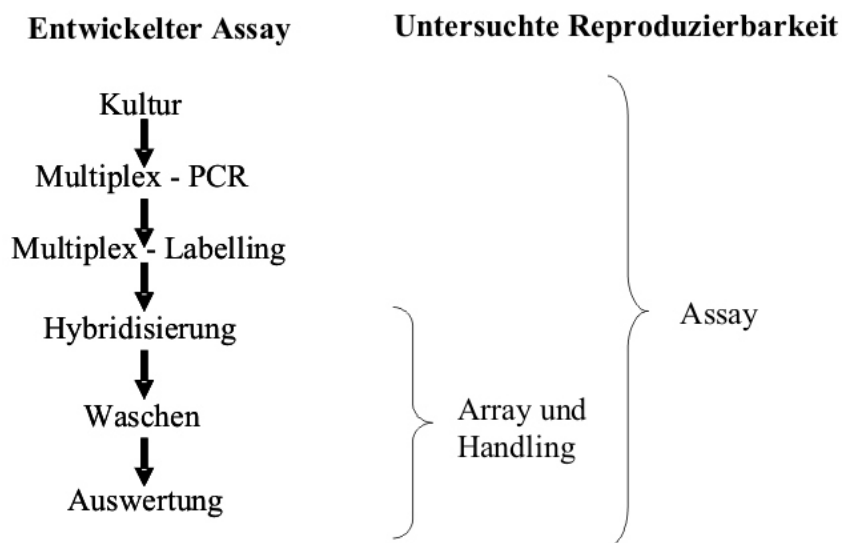


Abb. 3.23: Schematische Darstellung der untersuchten Reproduzierbarkeiten von Assay und Array

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Hybridisierungs-Prozesses, wurde ein Multiplex-PCR-Produkt von *B.cereus* ATCC10987 auf drei verschiedenen Microarrays hybridisiert. Nach einer Hybridisierungsdauer von 16 Stunden wurden die Slides gewaschen, eingelesen und ausgewertet. Um Spotting-abhängige Variabilitäten gering zu halten, wurden die Slides auf den Mittelwert aller Spottingkontrollen normalisiert. Der Vergleich der absoluten Fluoreszenzintensitäten zeigt, dass sich die Werte der Sonden bis zu einem Faktor 10 unterscheiden (nicht gezeigt). Dies ist auch bei der Auswertung des Signal-Rausch-Verhältnisses zu erkennen, wo die Werte von  $3.9 \pm 0.5$  bis  $25.3 \pm 4.2$  schwanken (Abb 3.24).

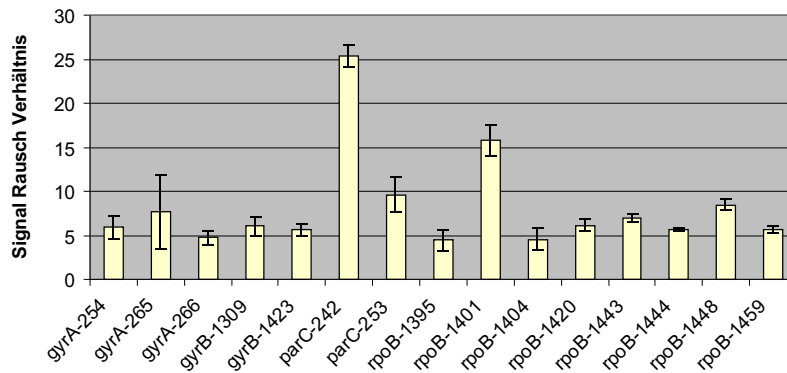


Abb. 3.24: Reproduzierbarkeit der Signalintensität der Perfect-Match-Sonden

Trotzdem war immer ein ausreichend starkes Signal (Signal-Rausch-Verhältnis größer 3) bei allen Slides gegeben und zusätzlich wurden auch alle Perfect-Match-Sonden richtig erkannt und konnten gegenüber den Mismatch-Sonden abgegrenzt werden, da sie mindestens 2,5-fach stärker fluoreszierten (Intensität der Mismatch-Sonden maximal 0,39)(Abb. 3.25). Der Standardfehler des Mittelwerts variierte von 0,01 bis 0,06, was als niedrig einzustufen gilt. Somit konnte eine prozentuale Abweichung der erhaltenen Intensitäten von durchschnittlich 12,5% innerhalb der Array-Replikate ermittelt werden.

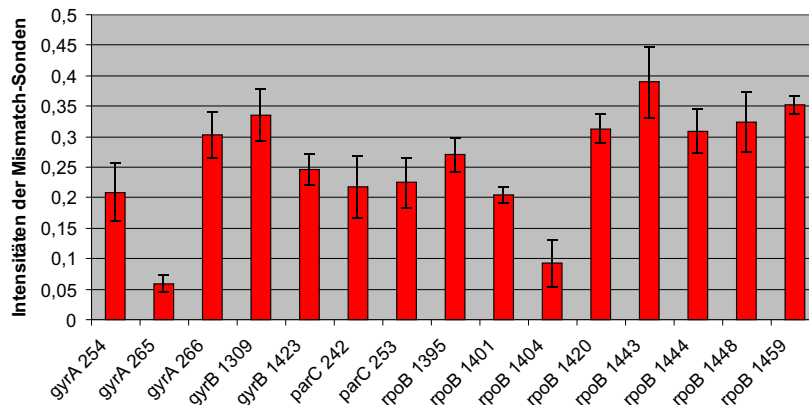


Abb. 3.25: Reproduzierbarkeit der Diskriminierungsfähigkeit der Mismatch-Sonden

Um die Reproduzierbarkeit des kompletten Versuchsablaufes von der Multiplex-PCR bis zum Auswerten zu bestimmen, wurden drei unabhängige Multiplex-PCR-

Ansätze mit *B. cereus* ATCC10987 erzeugt und im Anschluss daran ebenfalls getrennt markiert (Abb. 3.26 A). Im Anschluss daran wurden die Ansätze auf drei unterschiedlichen Microarrays separat hybridisiert, eingelesen und wie zuvor ausgewertet (Abb 3.26 C und D).

Bei dieser Versuchsreihe wurden alle Nukleotidpositionen richtig diskriminiert und alle Perfect-Match-Sonden besaßen ein Signal-Rausch-Verhältnis von größer gleich 3. Die Mittelwerte der Intensitäten der Mismatch-Sonden variierten ebenfalls wie zuvor, zwischen 0,01 und 0,6 mit einem gemittelten Standardfehler von 12,64%.

Das Signal-Rausch-Verhältnis der Perfect-Match-Sonden variierte zwischen  $7,2 \pm 3,1$  bis  $43,3 \pm 2,3$  (Abb. 3.26), was bedeutet, dass für den gesamten Versuchsablauf ein Signal-Rausch-Verhältnis mit einem gemittelten Standardfehler von 26,7% zu erwarten ist.

### 3.5 Entwicklung des Microarrays „YpRes“

Der Microarray zu Detektion von Resistenzgenen in *Yersinia pestis* besteht aus insgesamt 46 sequenzverschiedenen Sonden, welche in sechs räumlich getrennten Replikaten angeordnet sind. 36 Sonden davon werden genutzt, um neun unterschiedliche Nukleotidpositionen des Gens *gyrA* hinsichtlich von Punktmutationen zu untersuchen, acht Sonden werden genutzt, um Resistenzgene nachzuweisen und zwei Sonden stehen für Auswertung und Qualitätskontrollen zur Verfügung, wobei diese Sonden mehrfach pro Replikat aufgetragen wurden.

Ähnlich wie bei dem Modul „BaRes“ wurden die Sonden zur Untersuchung von Nukleotidpositionen genauestens bioinformatisch untersucht, verglichen und schließlich empirisch an die Bedürfnisse des Microarrays angepasst.

Anders als beim Modul „BaRes“ wurde bei „YpRes“ auf redundante Sonden bei der Detektion von Resistenzgenen verzichtet. Dies wäre bei der Detektion der Tetracyclin-Resistenzgene *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* und *tet(D)* möglich gewesen, hätte aber aufgrund der Anzahl der dann zu spottenden Sonden mit dem TopSpot E (n=52) einen zusätzlichen Druckschritt gefordert, dessen größerer technischer Aufwand der Aussage dieser zusätzlichen vier Sonden nicht gerecht gewesen wäre.

Die Auswahl der restlichen Resistenzgene wurde aufgrund von Literaturrecherchen durchgeführt und deckt alle bis heute in *Yersinia* beschriebenen aminoglycosid-modifizierende Resistenzgene ab. Zusätzlich wurden weitere Resistenzgene hinzugenommen, deren Auswahl im Diskussionsteil dieser Arbeit näher erläutert wird.

*B. cereus* ATCC 10987 (wildtyp)

Reproduzierbarkeit des Assays  
3 unabhängige Versuchsanordnungen

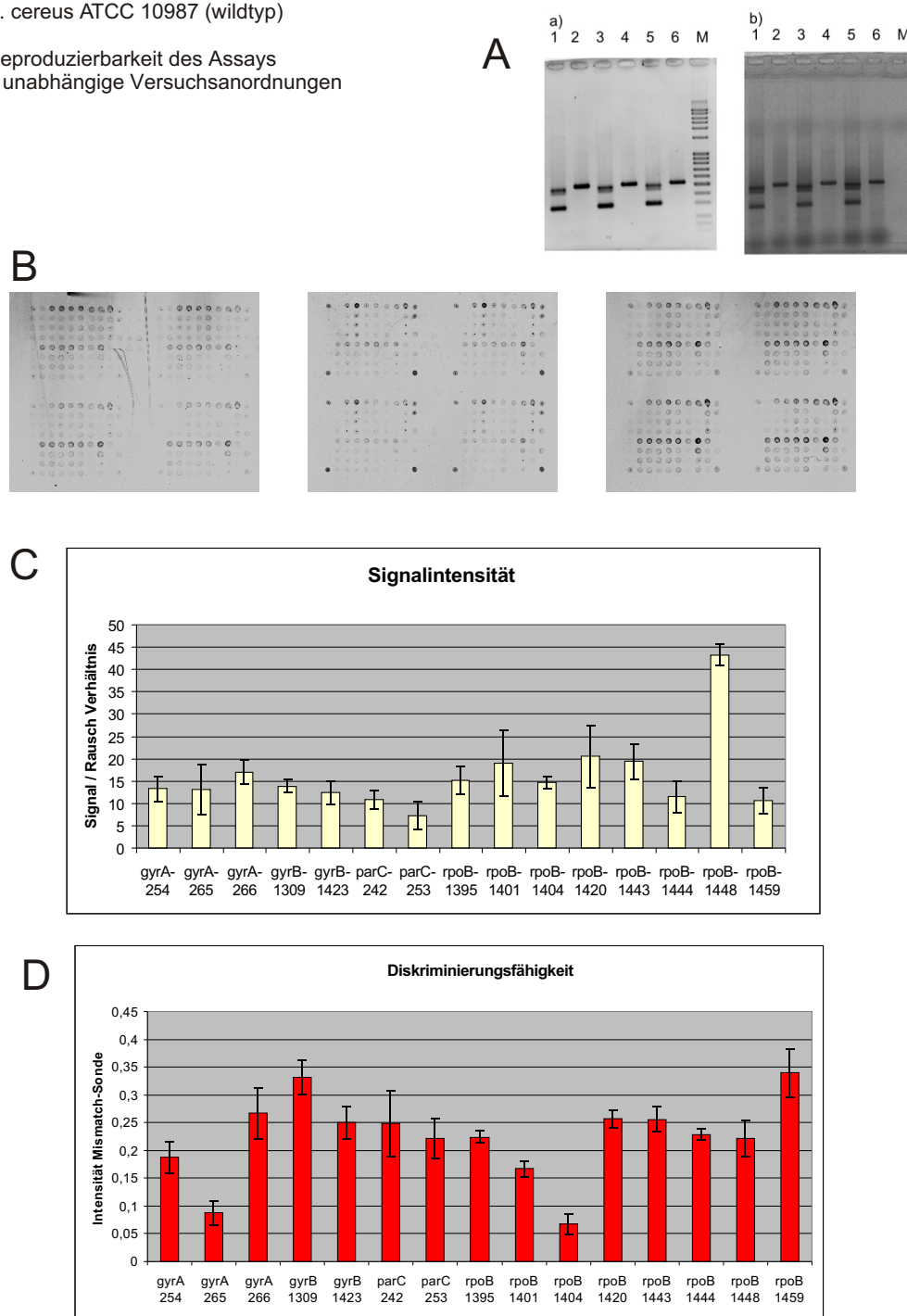


Abb. 3.26: Reproduzierbarkeit des gesamten „BaRes“-Assays. A EtBr- und Fluoreszenzbilder der verwendeten DNA-Ansätze. B Hybridisierungsbilder. C Reproduzierbarkeit der Signalintensität der Perfect-Match-Sonden. D Reproduzierbarkeit der Diskriminierungsfähigkeit der Mismatch-Sonden.

### 3.5.1 Detektionspotential - „YpRes“

Tab. 3.11 zeigt eine Übersicht über die nachweisbaren Gene und detektierbaren Nukleotidmutationen mit dem entwickelten Microarray Modul „YpRes“.

Tab. 3.11: Detektionspotential von „YpRes“

Nr	Gen	beobachtete Mutation		Quelle
		(nt-Position)	(aa-Position)	
1	<i>gyrA</i>	G219-T	GyrA67 A → S	[79]
2	<i>gyrA</i>	G260-A	GyrA81 G → D	[79]
3	<i>gyrA</i>	G259-T	GyrA81 G → C	[79]
4	<i>gyrA</i>	G262-A	GyrA82 D → N	diese Arbeit
5	<i>gyrA</i>	G266-T	GyrA83 S → I	[128]
6	<i>gyrA</i>	C267-A	GyrA83 S → R	[79]
7	<i>gyrA</i>	C267-G	GyrA83 S → R	[79]
8	<i>gyrA</i>	G268-C	GyrA84 A → P	[79]
9	<i>gyrA</i>	G277-A	GyrA87 D → N	[79]
10	<i>gyrA</i>	G277-T	GyrA87 D → Y	[79]
11	<i>gyrA</i>	G335-C	GyrA106 Q → H	[79]
12	<i>tet(A)</i>			
13	<i>tet(B)</i>			[37]
14	<i>tet(C)</i>			[51]
15	<i>tet(D)</i>			[59]
16	<i>aac3-Ia</i>			
17	<i>aac3-IIa</i>			
18	<i>aac3-IVa</i>			[37]
19	<i>ant(2'')-Ia</i>			
20	<i>ant(3'')-Ia</i>			
21	<i>aph(3'')-Ib</i>			[59]
22	<i>aph(6)-Id</i>			[59]

## 3.6 Hybridisierungsergebnisse - „YpRes“

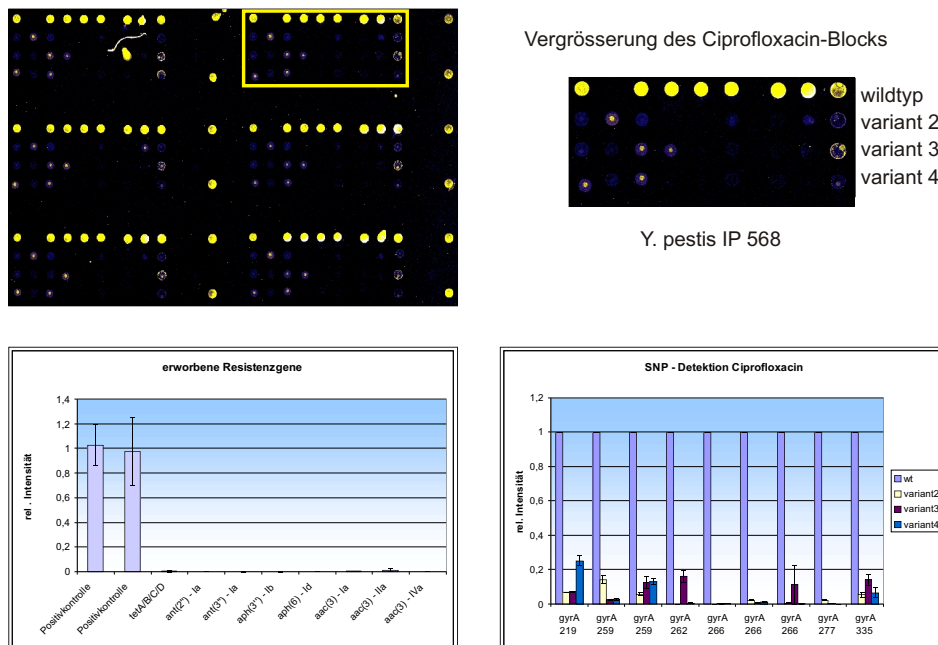
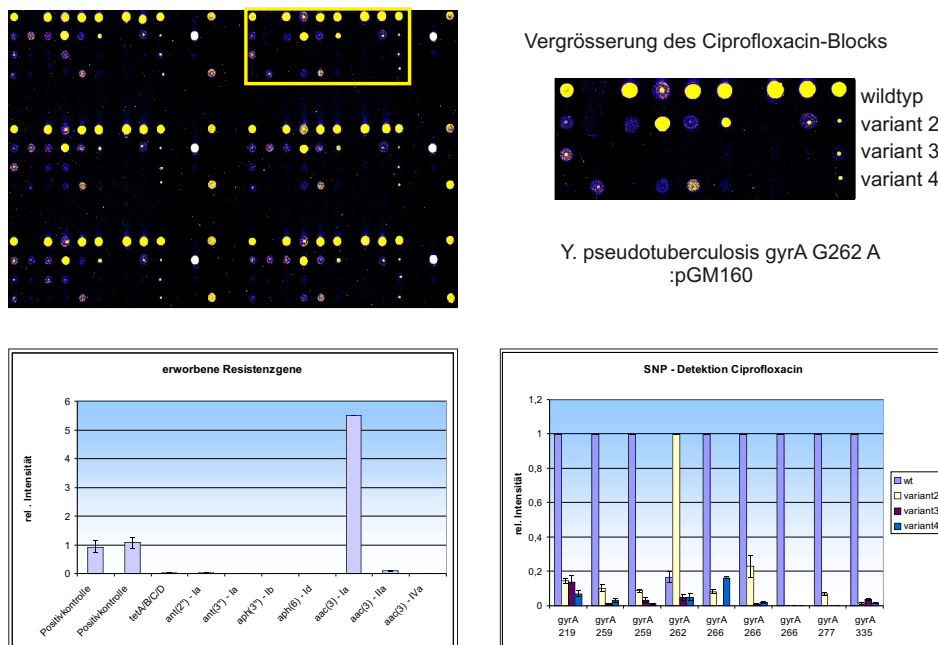
### 3.6.1 Allgemein

Die Auswertung wurde gemäß der bereits im Material- und Methodenteil beschriebenen Routine durchgeführt. Die grafische Datenaufbereitung erfolgte analog zu dem Microarray „BaRes“. Links oben wird das Hybridisierungsbild des ganzen Arrays dargestellt sowie eine vergrößerte Ansicht eines Blocks zur Bestimmung möglicher resistenzvermittelnder Punktmutationen. Im unteren Teil einer jeden Auswertung sind als Balkendiagramm stets die relativen Intensitäten der Sonden zur Untersuchung von möglichen Mutationen dargestellt und daneben - ebenfalls als Balkendiagramm - die relativen Intensitäten der Resistenzgensonden.

Zur Evaluation wurde der Microarray mit allen vorhandenen Genotypen speziesübergreifend getestet. Zur Verfügung standen fünf wildtyp-*Y. pestis*-Stämme IP554, IP568 und IP670 vom Institut Pasteur sowie EV76 und KIM3a aus dem eigenen Haus. Des Weiteren stand *Y. pseudotuberculosis* DSM8992 zur Verfügung sowie vier direkt davon abstammende isolierte Mutanten.

Dabei konnten alle untersuchten Nukleotidpositionen korrekt und eindeutig bestimmt werden. Auch der Einsatz von Misch-DNA zur Simulation der Präsenz mehrerer Resistenzgene in einem Organismus konnte erfolgreich durchgeführt werden. Dabei wurden alle vorhandenen und detektierbaren Resistenzgene durch den Microarray und seine Auswertroutine richtig erkannt. Auch der Wildtypstamm *Y. enterocolitica* DSM4780 wurde hybridisiert, um festzustellen ob dies möglich ist. Eine solche Aussage konnte nur empirisch getestet werden, da sich in zwei Sondenätzen jeweils ein 1-nt-großer Sequenzunterschied zwischen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* zeigte. Da diese Mutationen jedoch nur an den äußersten Enden der Sonde auftraten und keine zentrale Position betrafen, war das Hybridisierungssignal stark genug, um gemäß den vorher bereits geltenden Qualitätskriterien korrekt ausgewertet zu werden.

Im Folgenden sind exemplarisch vier Hybridisierungsbilder verschiedener Genotypen dargestellt (Abb. 3.27 - 30)


Abb. 3.27: Hybridisierungsergebnis *Y. pestis* IP568

Abb. 3.28: Hybridisierungsergebnis *Y. pseudotuberculosis* Mut82 pGM160

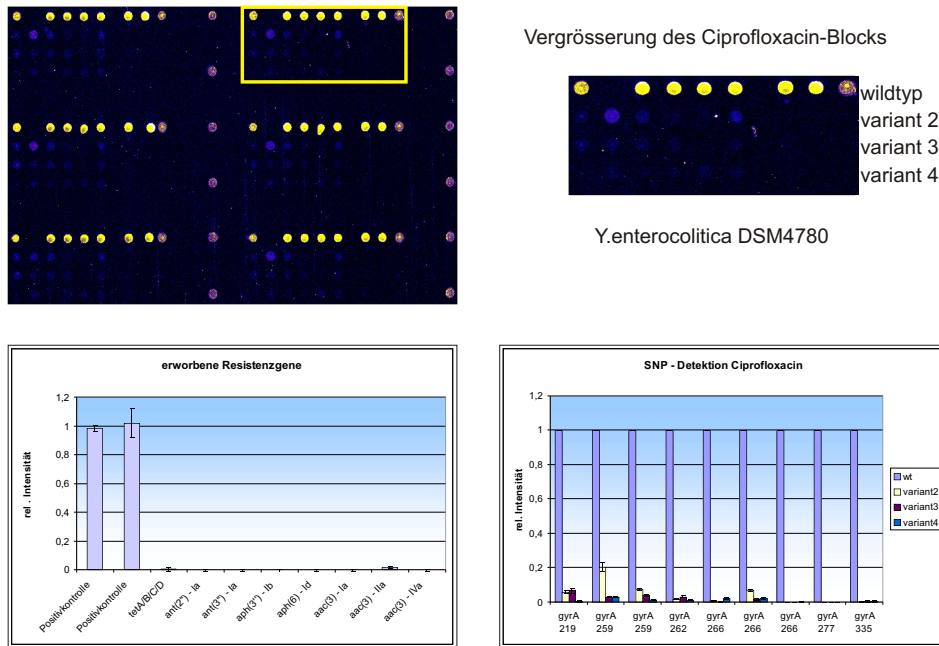


Abb. 3.29: Hybridisierungsergebnis *Y. enterocolitica* DSM4780

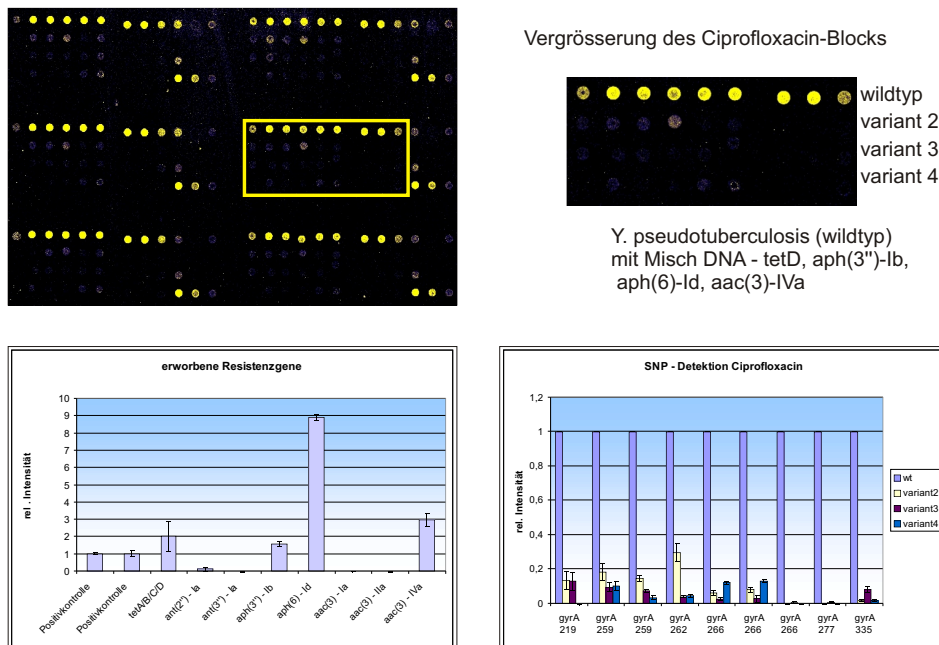


Abb. 3.30: Hybridisierungsergebnis *Y. pseudotuberculosis* DSM8992 mit Misch-DNA



### 3.6.2 Reproduzierbarkeit

Nach Erhalt der Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie des Microarrays „BaRes“, wurde sich bei dem Microarray „YpRes“ darauf beschränkt, die Reproduzierbarkeit der Gesamt-Assays zu bestimmen (Abb. 3.23), da dies den für die Anwendung wichtigeren Wert darstellt und gleichzeitig die Reproduzierbarkeit des Hybridisierungs- und Waschschruttes mit einschließt.

Um die Reproduzierbarkeit des Versuchsablaufes von der Probennahme bis zur Auswertung zu bestimmen, wurden drei unabhängig entnommene Proben der Mutante Mut82 in den entwickelten Assay eingebracht. Dazu wurde das Gen *gyrA* amplifiziert, markiert (Abb. 3.31 oben) und anschließend auf dem Array hybridisiert. Die Auswertung der einzelnen Arrays erfolgt ebenfalls separat und die Werte wurden miteinander verglichen.

Innerhalb dieser Versuchsanordnung konnten von den Microarrays alle untersuchten Nukleotidpositionen des Gens *gyrA* richtig identifiziert werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis der Perfect-Match-Sonden war dabei stets größer gleich drei und somit für eine verwertbare Aussage immer verwendbar. Die Stärke des Signal-Rausch-Verhältnisses variierte dabei zwischen  $7,6 \pm 1,9$  und  $37,9 \pm 13,8$ .

Analog dazu zeigten auch die absoluten Intensitäten Schwankungen um durchschnittlich 26,27%. Der Vergleich der Signalintensitäten zueinander zeigte eine Spannweite der absoluten Nettointensität von  $9666 \pm 774$  bis  $54960 \pm 11894$ , was ungefähr einen Faktor von 5,5 darstellt (nicht gezeigt).

Die Intensitäten der Mismatch-Sonden schwankten zwischen den einzelnen hybridisierten Microarrays zwischen 0,02 und 0,35 mit einem gemittelten Standardfehler von 31,35%. Die höchste Intensität einer Mismatch-Sonde innerhalb dieser Versuchreihe war jedoch 0,38 und somit eine gute Diskriminierungsfähigkeit bescheinigt.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass dieser Microarray korrekte Ergebnisse liefern kann, wenngleich stärkere Schwankungen als bei dem Microarray „BaRes“ im Bereich der Diskriminierung auftraten.

### 3.6.3 Blind-Studie

Da bei der Evaluation des Microarrays die Hybridisierung mit *Y. enterocolitica* DSM4789 erfolgreich durchgeführt werden konnte (Abb. 3.29), wurde eine Blind-Studie geplant, um eine mögliche Anwendung in der klinischen Routine zu testen und somit auch eine weitere Kontrolle zur Robustheit der Methode zu erhalten,

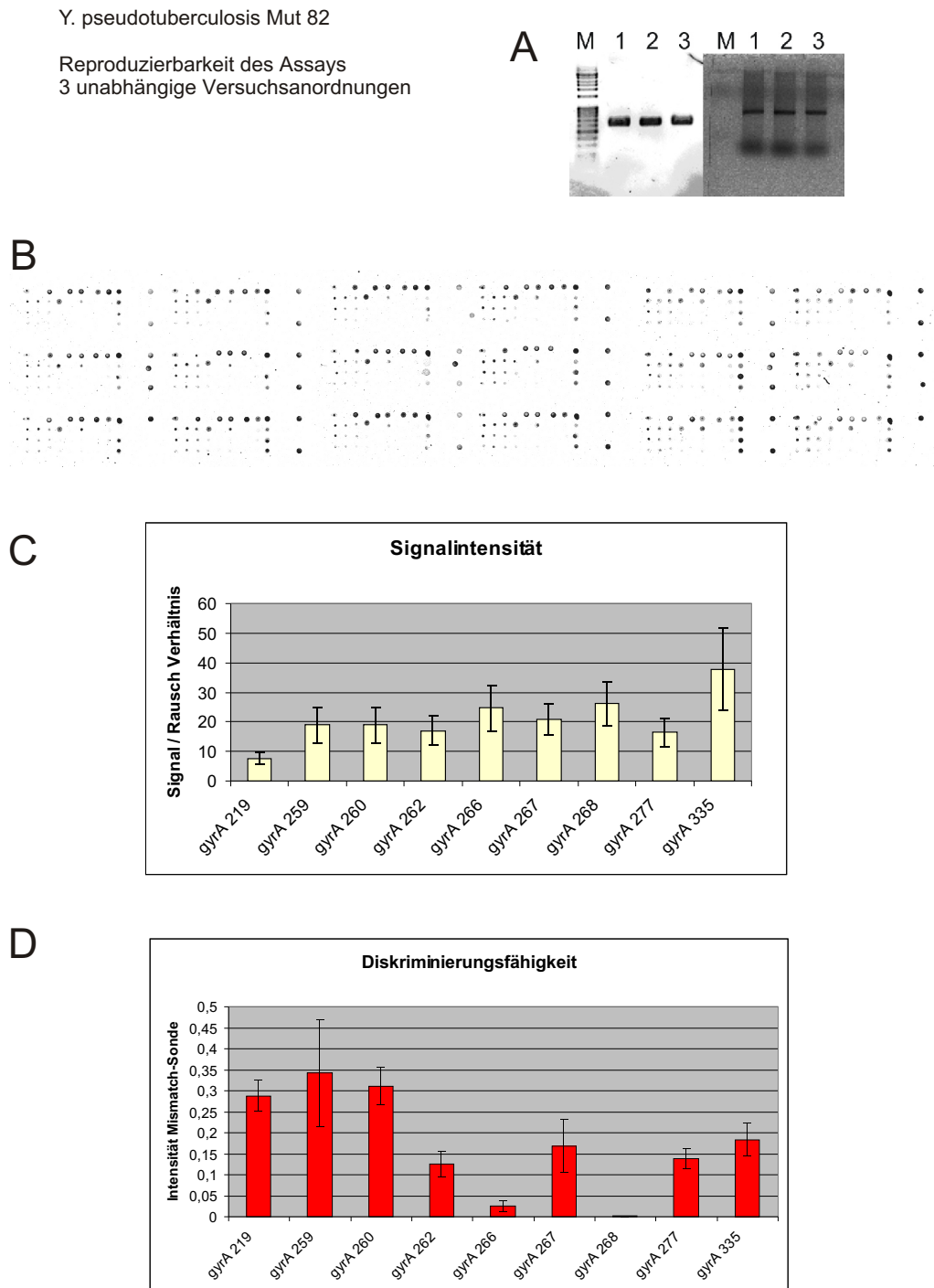


Abb. 3.31: Reproduzierbarkeit des gesamten „YpRes“-Assays. A EtBr- und Fluoreszenzbilder der verwendeten DNA-Ansätze. B Hybridisierungsbilder. C Reproduzierbarkeit der Signalintensität der Perfect-Match-Sonden. D Reproduzierbarkeit der Diskriminierungsfähigkeit der Mismatch-Sonden.

wohlwissend, dass die entwickelten und ausgewählten Sonden zur Bestimmung von Punktmutationen nicht zwangsläufig immer funktionieren müssen, da *Y. enterocolitica*-spezifische Mutationen bei der Entwicklung der Sonden nicht berücksichtigt worden waren.

Die Studie wurde zusammen mit Dr. Tietze vom Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger geplant. Als Ausgangssituation wurden 40 unbekannte Stämme mit klinischem Hintergrund aus den Jahren 2005 und 2006 gewählt. Bei den durch Dr. Tietze verblindeten Proben war das Antibiotogramm nur Dr. Tietze bekannt und wurde erst nach Abschluss der Hybridisierungsarbeiten zur Diskussion der Ergebnisse zur Verfügung gestellt.

Keiner der ausgewählten Stämme zeigte nach CLSI-Standard eine klinisch relevante Resistenz gegen Ciprofloxacin, jedoch besaß eine Anzahl von Isolaten eine Nalidixin-Resistenz. Bei Nalidixin handelt es sich - wie bei Ciprofloxacin - um ein Chinolon, dessen Resistenz auch auf denselben Mutationen im Gen *gyrA* basieren.

Von allen Stämmen wurden eine Multiplex-PCR und eine PCR zur Amplifizierung des Gens *gyrA* durchgeführt, die benötigten Markierungsreaktionen und die anschließenden Hybridisierungsschritte auf Microarrays mit dem Layout „YpRes“. In Anhang A 5 sind alle Ergebnisse im Detail dargestellt, eine zusammenfassende Tabelle aufgeschlüsselt nach Genotyp ist in Tab. 3.12 ersichtlich.

Insgesamt wurden die Phenotypen von 38 der 40 Stämme richtig erkannt, was einem Prozentsatz von 95% entspricht. Bei den zwei nicht korrekten Ergebnissen handelte es sich um Falsch-Negative Ergebnisse. Es handelte sich dabei um die Proben Nr.1 und Nr. 36. Bei diesen Proben wurde zur Überprüfung des Antibiotogramms eine erneute phenotypische Resistenzprüfung durchgeführt und die erhaltenen Resistenzen konnten bestätigt werden.

Bei Stamm Nr. 1 sollte eine Streptomycin-Resistenz vorliegen mit einer MHK  $>32\mu\text{g/ml}$ . Dies konnte nicht mit dem Microarray gezeigt werden und auch die zu diesem Stamm gehörige Multiplex-PCR zeigte keine Amplifikate (Anhang A 5), weder von den beiden Streptomycinphosphorylasen, noch von dem möglichen Gen *ant(3'')-Ia*.

Bei Stamm Nr. 36 wurde ein ungewöhnliches Hybridisierungsmuster der *gyrA*-Sonden festgestellt. Weder eine Wildtyp-Sequenz, noch eine mögliche Mutantensequenz konnten an den Sonden für die Nukleotidpositionen 266, 267 und 268 eindeutig bestimmt werden. Die Hybridisierung wurde mit dem gleichem Ergebnis wiederholt. Eine Aussage über eine vorhandene Mutation konnte nicht getroffen werden und so-

Tab. 3.12: Ergebnis der Blind-Studie aufgeschlüsselt nach Genotyp und Phänotyp. Genotypische Ergebnisse stammen aus den Microarrayexperimenten, phänotypischen Ergebnisse stammen von Dr. Tietze. (+ Gen vorhanden, - Gen nicht vorhanden, MHK Minimal Hemmkonzentration „resistent“ ist für die geprüften Antibiotika  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ )

Anzahl	bestimmter Genotyp						Phänotyp MHK ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	<i>gyrA</i>	<i>aac3-Ia</i>	<i>ant(3)-Ia</i>	<i>aph(6'')-Id</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>tet(A/B/C/D)</i>	Nalidixin	Gentamicin	Streptomycin	Tetracyclin
21	-	-	-	-	-	-				
1	266T	-	-	-	-	-	32			
1	267G	-	+	-	-	-	32		>64	
1	277T	-	+	-	-	-	>32		>64	
1	-	+	-	-	-	-		8		
7	-	-	+	-	-	-			(>)32	
1	-	-	-	+	+	-			>64	
4	-	-	-	+	+	+			>64	8
1	-	-	-	-	-	+				8
1	?	-	-	-	-	-	>32			
1	-	-	-	-	-	-			32	

mit wurde dieses Ergebnis als Falsch-Negativ eingestuft. Eine im Anschluss an diese Blind-Studie durchgeführte Sequenzierung des Gens *gyrA* konnte zeigen, dass bei diesem Isolat eine Punktmutation in Nukleotidposition 265 vorlag. Eine solche Mutation ist eine *Y. enterocolitica*-spezifische Mutation und kann mit dem entwickelten Microarray nicht erfasst werden.

Unter den vorhandenen und untersuchten Proben der Blindstudie war nicht ein Wildtyp-Stamm, da alle *Y. enterocolitica*-Isolate Resistenzen aufwiesen. Jedoch handelte es sich bei diesen Resistenzen um solche, die nicht mit dem vorhandenen Microarray nachgewiesen werden können, wie z.B. Resistenzen gegen Sulfonamide oder  $\beta$ -Laktame.

### 3.7 Datenbank

Die Datenbank zur Verwaltung der Ergebnisse wurde mit MSAccess programmiert und lässt alle gewünschten Funktionalitäten zu.

Die Datenbank ansich ist nicht in SQL programmiert und die Benutzeroberfläche und Befehle durch die Verwendung von VisualBasic für jeden Rechner mit den angegebenen Anforderungen verfügbar. Damit ist der professionelle Einsatz dieser Datenbank für einen Hochdurchsatz an Daten sicherlich nicht gegeben, aber sie lässt sich bei mittelgroßen Projekten wie den hier durchgeführten gut anwenden.

Nach Start der Datenbank präsentiert sich ein Auswahlbildschirm, der es zum einen ermöglicht auf die Daten selbst zuzugreifen, zum anderen aber auch einen Gesamtbericht über alle in der Datenbank befindlichen Hybridisierungsversuche zu lesen und auszudrucken.

Der Datenzugriff erfolgt über ein klar strukturiertes Fenster, welches auf einen Blick wichtige Daten des Versuchs und des verwendeten Microarrays aufweist: Oberfläche, Spottingdatum und Sondenlayout. Tag und Art der Prozessierung, der Hybridisierung und des Waschens in Form von Kurznamen können dort ebenfalls eingegeben, geändert oder gelöscht werden. Des Weiteren ist es möglich, über ein Browserfenster ein zu diesem Datensatz passendes Hybridisierungsbild aufzurufen und abzuspeichern (Abb 3.32).

Abb. 3.32: Bild der Datenbankeingabemaske

Im unteren Teil des Fensters ist es in Karteikartenformat möglich, die näheren Informationen zu den verwendeten Protokollen einzusehen. Änderungen und Eingaben von neuen Protokollen erfolgen nach Betätigen von Knöpfen über „pop-up“-Fenster. Alle zu diesem Microarray gehörenden Daten und Protokolle können in einem Einzelbericht angesehen und ausgedruckt werden.

Um die halbautomatische Auswertroutine zu starten, muss die von GenePixPro 4.1 gespeicherte Datei (\*.gpr) über ein Browserfenster geladen werden. Im Anschluss daran wird die entwickelte Routine über einen Knopfdruck gestartet. Dabei wird die ausgewählte Ergebnisdatei geladen und in eine slidespezifische Auswertdatei kopiert. Bei dieser handelt es sich um eine komplexe Exceldatei. Nach Durchführung dieser Prozedur wird diese Datei automatisch unter dem Namen der Ergebnisdatei, jedoch mit Excel-Suffix gespeichert (\*.xls). Somit gehen keine Rohdaten verloren und eine nachträgliche manuelle Auswertung ist jederzeit möglich.

## 4 Diskussion

### 4.1 Resistenzprüfung

Das erhöhte Auftreten von Mikroorganismen, welche gegen allgemein verwendete Antibiotika resistent sind, erhöht die Notwendigkeit einer schnelleren Diagnose und strengen Überwachung der Resistenzverbreitung sowohl im Krankenhaus, als auch ausserhalb medizinischer Einrichtungen. Im Durchschnitt nehmen die verwendeten phänotypischen Standardmethoden zur Resistenzbestimmung zwei bis drei Tage in Anspruch, bis dass ein Resistenzprofil vorliegt. Diese Dauer ist für eine Infektion mit einem hochpathogenen Erreger nicht schnell genug. Folglich müssen neue Strategien der Antibiotikaresistenzprüfung entwickelt und evaluiert werden.

#### 4.1.1 Phänotypische Resistenztests

Phänotypische Resistenztests sind derzeit die Standardmethoden der Resistenzbestimmung, da sie günstig und anwendbar auf eine Vielzahl von antibiotischen Substanzen sind. Dabei werden in der Regel die Antibiotika getestet, welche bei der Infektion verordnet werden.

Die Resultate, die auf allgemein angewandten Agar-Diffusions-Tests beruhen, basieren auf der subjektiven Deutung der Wachstumshemmungszonen und erfordern erfahrenes Personal. Fehlinterpretationen dieser Hemmzonen können im schlimmsten Fall zu Behandlungsausfällen führen [92]. Ausserdem könnten manche Resistenzen zum Beispiel durch unkultivierbare Organismen unentdeckt bleiben, die Konzentration des Test-Antibiotikums zu hoch gewählt oder die Inokulummenge zu gering sein. Auch die Expression einer geringen Resistenz oder das Vorhandensein eines Bakteriumgemischs kann die Ergebnisse solcher Tests in Frage stellen. Gerade die Isolierung und die damit verbundene Kultivierung des Organismus lässt die Analysezeit ansteigen, ist jedoch als absolut notwendig gezeigt worden [75]. Automatisierte Auswertungsgeräte, welche mit dem Mikrobouillonverdünnungsverfahren arbeiten,

sind bereits für die Beschleunigung der Resistenzprüfung entwickelt worden (z. B. Microscan oder BD Phoenix) [106].

Da schwere Infektionen zeitnah behandelt werden müssen, beginnt die antibiotische Behandlung häufig bevor die Resistenztestung beendet ist. Aus diesem Grund ist die gegenwärtige phänotypische antibiotische Resistenz-Diagnose in vielen Bereichen nicht mehr zeitgemäß, jedoch unumgänglich, da keine besseren und preislich vergleichbaren Alternativen zur Verfügung stehen.

### 4.1.2 Genotypische Resistenztests

Eine genotypische Resistenzprüfung hat das Potential, eine schnellere und zuverlässigere Lösung anzubieten. Die Vorteile einer solchen Analyse sind die folgenden:

Direkt nach Isolation des Bakteriums kann ein solcher Test durchgeführt werden. Dabei kann unter Umständen auf eine vorherige DNA-Isolierung verzichtet werden. Dieser Zeitgewinn lässt sich gerade bei langsam wachsenden Organismen ausbauen, da diese nicht mehr aufwendig kultiviert werden müssen. Dies trifft auch auf schwer- oder unkultivierbare Organismen zu, die genotypisch untersucht werden können. Auch die Bewertung von Resistenzen kann objektiviert werden, da man auf die subjektive Wahrnehmung und Abschätzen einer Wachstumshemmzone verzichten kann. Dabei können auch die Resistenz nachgewiesen werden, die phänotypisch nur schwach, oder gar nicht zu erkennen sind. Letztlich sind die Organismen im Labor auch nicht mehr so lange präsent, wodurch die Gefahr einer Kontamination des Labors ebenfalls reduziert wird.

Zur Zeit besitzen genotypische Analysemethoden jedoch auch Einschränkungen, die mit der herkömmlichen phänotypischen Analyse verglichen werden müssen. Die Anwesenheit nur weniger Organismen in einer klinischen Probe lässt die Sensitivität der Methode manchmal als nicht ausreichend erscheinen, sodass falsch-negative Ergebnisse erhalten werden können. Dies gilt ebenso, wenn unbekannte Resistenzmechanismen vorliegen, die von möglichen komplexen Methoden nicht erfasst werden. Das liegt daran, dass man nur auf die Resistenzen hin testen kann, die man auch kennt. Zusätzlich wird die Entwicklung solcher Tests insoweit erschwert, dass aufgrund zum Teil Organismus-spezifischer Sequenzen für unterschiedliche Organismen die Tests neu entwickelt werden müssen.

Bei der genotypischen Untersuchung wird in der Regel nicht die Qualität der Resistenz ermittelt. Somit ist eine Unterscheidung zwischen klinischer Relevanz und nicht-klinischer Relevanz nicht möglich. Zusätzlich können auch falsch-positive Re-



sultate auftreten, wenn beispielsweise nicht-exprimierte Gene detektiert werden. Ein großer Nachteil ist zur Zeit sicherlich das Fehlen anerkannter Standards für das Durchführen der molekularen Methoden zur Resistenzbestimmung. Dies kann daran liegen, dass es bislang nur wenige klinische Versuche hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und der Genauigkeit gibt. Abschließend ist auch noch ein wirtschaftlicher Aspekt zu nennen. Die phänotypischen Tests stellen die günstigere Methode dar und somit ist die Genotypisierung zur Zeit die uninteressantere Methode der Wahl.

### 4.1.3 Einführung des Systems

Um ein anspruchsvolles klinisch einsetzbares Diagnostiktool zu entwickeln, muss eine reproduzierbare, spezifische und sensitive Analyse gegeben sein. Dazu müssen unter anderem die Oberfläche für die Immobilisierung, die Prähybridisierung und der Puffer sowie die Methode der Sonden-Immobilisierung sorgfältig gewählt werden [15]. Auch der Etat für die zahlreichen Experimente, die für die Evaluierung des Systems notwendig sind, muß beachtet werden.

Für die Grundstruktur des Arrays entschied man sich für ein System, dass von unserem Kooperationspartner vorgeschlagen wurde. In zwei ausführlichen Arbeiten sind dort Immobilisierungsstrategien und Oberflächen hinsichtlich ihrer Signalintensität und Zuverlässigkeit untersucht worden [131, 72]. Aufgrund der Erfahrung des Kooperationspartners wurde sich für die Kopplungsstrategie von phospho-modifizierten Oligonukleotiden auf einer Aminosilanoberfläche entschieden. Die Immobilisierung sollte via EDC-Chemie durchgeführt werden. Diese Art des Microarrayaufbaus ist eher selten anzutreffen, jedoch bietet sie neben der einfachen Handhabung mit unserem verwendeten Spottingssystem auch ein gutes Spottingbild, eine akzeptable homogene Sondenverteilung innerhalb eines Spots, eine gute Reproduzierbarkeit in der Herstellung und gleichzeitig eine kostengünstige Variante, da alleine die Phosphat-Modifikation in der Regel günstiger zu erweben ist als beispielsweise eine Aminomodifikation.

Für die Spottingoberfläche haben wir uns für eine Aminomodifizierung entschieden, die wir käuflich erworben haben. Zwar ist diese Aminopropyltriethoxysilanoberfläche leicht selbst für den Labormaßstab herzustellen, doch aufgrund der Reproduzierbarkeit der Beschichtungsqualität haben wir uns für ein kommerzielles Produkt entschieden. Die erhaltenen Ergebnisse lassen unsere Wahl als richtig erscheinen.

## 4.2 Sonden – Design und Leistung

### 4.2.1 Sequenz-Analyse und Auswahl von Resistenzgenen

#### „BaRes“

Für die Entwicklung der Sonden wurde die dazu relevante Literatur recherchiert und alle bekannten Resistenz-verursachenden Mutationen bei *B. anthracis* gesammelt und ausgewertet. Dabei wurden sowohl klinische Isolate mit einbezogen wie auch *in-vitro* erzeugte Mutanten. Auch die zusätzlich bei Sporen [107] beobachteten Mutationen wurden in die Untersuchungen mit einbezogen. Abschließend wurden die in dieser Studie zusätzlich aufgetretenen und noch nicht beschriebenen Sequenzunterschiede ebenfalls bedacht. Somit ist es mit dem vorliegenden Array möglich, Rifampin und Ciprofloxacin vermittelnde Mutationen bei *B. anthracis* und *B. cereus* ATCC10987 zu detektieren.

Aufgrund von Datenbankrecherchen ist die Aussage möglich, dass alle bislang veröffentlichten Anthracis-Stämme sowie manche nahe verwandten *B. cereus*-Arten mit diesem Array ohne Einschränkung benutzt werden können. Der Begriff von nahe verwandten Anthracis-Stämmen ist aufgrund der heutzutage verwendeten Methoden zur Differenzierung beider Arten nicht immer gleich gewählt, zumal nach Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST) sehr nahe verwandte *B. cereus*-Stämme sich in den Genen *rpoB* und *gyrA*, *gyrB* und *parC* doch zum Teil sehr stark von anthracis-Stämmen unterscheiden. Eine genaue Aussage zu diesen „anthracis-like“-Stämmen [87, 86] kann allerdings erst nach Hybridisierung mit diesen erfolgen, da dies empirisch evaluiert werden muss und aufgrund der Sequenzunterschiede nicht vorhergesagt werden kann. Theoretisch jedoch soll das Speziesspektrum alle bis jetzt in der Datenbank vorhandenen *B. anthracis*, sowie *B. thuringiensis* konkukian 9727, *B. cereus* ATCC10987, *B. cereus* E33L(ZK) und *B. cereus* G9241 umfassen.

#### „YpRes“

Aufgrund der notwendigen Limitierung der Anzahl detektierbarer Resistenzgene durch den unausweichlichen Anreicherungsschritt der DNA, musste eine Auswahl an Resistenzgenen getroffen werden, deren Anzahl sowohl technisch realisierbar war, als auch einen möglichst großen Nutzen für eine spätere Aussagekraft zur Verfügung stellte.

Für alle ausgewählten Resistenzgene wurden Sonden und Primer entwickelt. Mit

Ausnahme von *tet(A)* standen für alle Resistenzgene mindestens eine Positivkontrolle zur Evaluierung der Sonden zu Verfügung. Die Lage der Sonden in den entsprechenden Genen wurde so ausgewählt, dass sie in konservierten Bereichen liegt wo sie auf alle in Datenbanken auftretenden verwandten Sequenzen passen würden. Dies wurde durch phylogentische Untersuchungen genauestens untersucht. Die Sondenlage innerhalb des detektierenden Strangs wurde so gelegt, dass davon ausgegangen werden kann, dass bei Beobachtung bislang unbekannter Sequenzen naher verwandter Resistenzgene diese ebenfalls mit dem präsentierten Microarray detektiert werden könnten.

Zur Detektion einer Tetracyclin-Resistenz bei dem gram-negativen Organismus *Yersinia pestis* entschied man, sich auf mögliche Efflux-Systeme zu beschränken, da dieser bei enterischen gram-negativen Bakterien der zumeist beobachtete Resistenzmechanismus ist [55, 124, 125, 5]. Unseres Wissens nach wurde in *Yersinia* noch nie zuvor ein anderes Gen mit einem ribosomalen Protektionsmechanismus beobachtet.

Bis jetzt konnte nur ein einziges Mal bei *E. coli* in einer Studie ein *tet(M)*-Gen beobachtet werden. Jedoch konnte dort nicht eindeutig gezeigt werden, dass dieses Gen eine Relevanz zeigt, weil es in Verbindung mit anderen Efflux-Resistenzgenen auftrat [25]. Bis jetzt wurden nur drei Tetracycline Resistenzgene in *Yersinia* beschrieben: *tet(B)*, *tet(C)* und *tet(D)* [37, 51, 59]. Diese sind mit dem Modul „YpRes“ erfasst. Zusätzlich wurde das Gen *tet(A)* hinzugenommen, da dieses gerade in Umweltisolaten sehr weit verbreitet ist. Bei solchen Isolaten konnte gezeigt werden, dass *tet(A)* mit 35% am zweithäufigsten auftrat nach *tet(B)* mit 63% [25]. Da wir konservierte Sonden benutzen, ähnlich den entwickelten Primer von Animov *et al.* [5], sind wir zuversichtlich auch weitere Efflux-basierende Tetracycline Gene detektieren zu können. Aufgrund des Mangels weiterer solcher Tetracyclin-Resistenz Gene konnte dies jedoch nicht überprüft werden.

Von der Vielzahl der bisher bekannten Mechanismen der Modifizierung von Aminoglykosiden und der diese Mechanismen kodierenden Resistenzgenen sind bis jetzt vier Gene in *Yersinia* beschrieben worden: *aac(3)-IVa*, *aph(3'')-Ib* und *aph(6'')-Id* sowie *ant(3'')-Ia*. Das erste wurde über ein Plasmid in *Yersinia pestis* eingebracht [37] und bewirkt eine Resistenz gegen Gentamicin. Die zwei folgenden Gene treten in der Regel nur in Kombination auf und wurden in einem natürlichen klinischen Isolat nachgewiesen [67] und bewirken eine Resistenz nur gegen Streptomycin. Das letzte Gen bewirkt eine Resistenz gegen Streptomycin und Spectinomycin und wurde ebenfalls in einem klinischen Isolat beobachtet [59]. Diese Gene wurde auf den

Microarray aufgenommen. Das Gen *ant(3'')-Ia* ist in 90% aller klinischen Isolate zu finden [133, 152] und unter den gram-negativen Bakterien weit verbreitet. Ebenfalls weit verbreitet ist das „Doppel“-Gen *aph(3'')-Ib - aph(6'')-Id*. Die anderen beschriebenen Genvarianten treten nur sehr selten auf [133, 134, 152]. Aus diesem Grund sind wir der Meinung, dass eine mögliche Streptomycin-Resistenz identifiziert werden kann. Als allumfassend ist diese Auswahl sicherlich nicht zu nennen, da in der Blind-Studie bereits die Resistenz eines Isolates nicht detektiert werden konnte. Dies kann unterschiedliche Gründe haben und wird im späteren Verlauf diskutiert werden.

Die Auswahl hinsichtlich möglicher Gentamicin-Resistenzgene hat sicherlich keine absolute Abdeckung; jedoch sind wir der Meinung, dass auch hier ein hinreichender klinischer Hintergrund mit der getroffenen Auswahl der zu detekierenden Gene vorliegt. *aac(3)-Ia* ist in ca. 30% der klinischen Isolate zu finden [152, 134, 146]. *aac(3)-IIa* gehört zu einer großen Gruppe von Genen, welche sehr homolog zu sein scheint [134, 152]. Dies wurde zwar beim Sondendesign mit berücksichtigt, jedoch ohne alle Gene, welche Proteine mit denselben Resistenzmechanismen codieren, erfassen zu können. Des Weiteren wurde das in *Yersinia* aufgetretene Gen *aac(3)-IVa* [37] erfasst und mit einer Sonde auf dem Microarray bedacht sowie das Gen *ant(2)-Ia*, welches ebenfalls einen hohen Verbreitungsgrad besitzt [98].

Resistenzen gegen Sulfonamide wurden nicht berücksichtigt, da diese Gruppe der Antibiotika nicht bei systemischen Infektionen eingesetzt wird und somit auch nicht zu Behandlung von *Yersinia pestis* empfohlen werden kann. Ebenfalls wurde eine Aufnahme zum Nachweis von Resistenzen gegen Penicilline und die neueren Cephalosporine der 3. Generation abgelehnt, da *Yersinia* ein chromosomal codiertes *ampC*-Gen aufweist, welches eine fast natürliche Resistenz gegen diese Antibiotika verzeichnet. Auch das ist ein Grund, wieso in Behandlungsempfehlungen diese Antibiotikaklasse heutzutage nicht mehr auftritt. Wegen der großen Nebenwirkungen sehr selten empfohlen - wenn dann nur bei Meningitis - wird Chloramphenicol. Da es sich bei diesem Antibiotikum jedoch um ein Bakteriostatikum handelt, welches den Erreger nicht tötet, sondern nur am Wachstum hindert, wurde auch dort auf die Aufnahme des Gens *cat* auf den Microarray verzichtet.

Zusammenfassend lässt sich darlegen, dass mit diesem Microarray alle bis jetzt bei *Yersinia* beschriebenen Resistenzgene erfasst und detektiert werden können. Zusätzlich wurde eine Auswahl der aus epidemiologischer Sicht wichtigsten klinisch relevanten Resistenzgene bei dem Sondendesign berücksichtigt.

### 4.2.2 Ergebnis des Sondendesigns

Die Grundanforderung an Sonden, welche auf einem Array zusammen hybridisiert werden sollen, sind gleiche Hybridisierungseigenschaften unter den gewählten Hybridisierungsbedingungen [68]. Dies kann man erreichen, indem man Sonden mit ähnlichen Schmelztemperaturen, ähnlichen Längen und möglichst geringen Sekundärstrukturen erstellt. Die Sonden für die Detektion relevanter Nukleotid-Positionen und der zu detektierenden Resistenzgene stellen dabei einen Kompromiss zwischen den einzelnen Parametern dar. Nur so kann über den gesamten Array eine möglichst gleiche Hybridisierungsfähigkeit erreicht werden. Trotz möglichst genauen *in-silico*-berechneten Sonden, mussten alle Sonden weitgehend empirisch optimiert werden. Zwar sind einige Programme entwickelt worden, um Hybridisierungssonden zu designen, jedoch stimmt die Vorhersage meistens nur vage mit den erwarteten Ergebnissen überein, sodass oftmals Sonden verkürzt oder verlängert werden mussten.

Mit den hier entwickelten Sonden konnten alle Einzelbasenpaaraustausche nach Optimierung richtig unterschieden werden. Dabei wiesen alle Perfect-Match-Sonden den vorher festgelegt Minimalschwellenwert für das Signal-Rausch-Verhältnis von 3 auf. Auch die Diskriminierung innerhalb der SONDENSätze war stets deutlich gegeben und wurde bei der Evaluierung des Arrays, der Bestimmung der Reproduzierbarkeit und der Kinetik ausgiebig untersucht. Dies soll im weiteren Verlauf diskutiert werden.

### 4.2.3 Einbringen künstlicher Mutationen

Der SONDENSatz gyrA254 auf dem Array „BaRes“ zeigte eine Kreuzhybridisierung bei Hybridisierung mit einer Wildtyp-Sequenz an. In der Wildtyp-Sequenz liegt das Nukleotid Guanin vor in der dazugehörigen Wildtyp-Sonde das Nukleotid Cytosin vor, um eine G-C Basenpaarung zu ermöglichen. Jedoch hybridisierte die markierte Wildtyp-DNA innerhalb des SONDENSatzes gyrA254 an der Sonde, die das Nukleotid Thymin an der fraglichen Stelle besitzt. Eine mögliche nicht-kanonische G-T Basenpaarung könnte als Ursache für diese Falsch-Hybridisierung gesehen werden. Da eine eindeutige Diskriminierung des Wildtyps so nicht möglich war, musste eine Neukonstruktion dieses SONDENSatzes durchgeführt werden. Da eine Verkürzung der Sonde zwar zu einem besseren Diskriminierungsergebnis führte, jedoch die absolute Signalintensität und damit auch das Signal-Rausch-Verhältnis für eine Auswertung nicht mehr ausreichte, musste ein neues Sondenkonzept angewendet werden. Guo

*et al.* [69] zeigten, dass es möglich ist, bei solchen Sonden durch Einbringen von zusätzlichen künstlichen Mutationen in die Sondensequenz eine höhere Diskriminierung zu erzielen. Dabei soll die künstlich eingebrachte Mutation mögliche Sekundärstrukturen und nicht-kanonische Basen-Paarungen destabilisieren. Bei der beschriebenen Arbeit führte die Arbeitsgruppe jedoch das Basenanalogue 3-nitropyrrol ein. Basenanaloga sind normalerweise sehr kostspielig und nicht von allen Oligonukleotidlieferanten zu erhalten.

In dieser Arbeit wurde versucht, dies durch den Austausch von natürlichen Nukleotiden zu erhalten. Dabei wurde in der hier vorliegenden Arbeit von vorneherein davon ausgegangen, dass die Störung einer G-C-Bindung sich destabilisierender auswirkt als die Störung einer A-T-Bindung, da die Bindung der G-C-Nukleotide durch drei Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt, während dies bei einer A-T-Bindung nur durch zwei Wasserstoffbrücken gewährleistet ist. Davon ausgehend, wurden verschiedene Positionen untersucht, an denen eine künstliche Mutation eingefügt wurde. Durch das zusätzliche Einbringen einer künstlichen Mutation musste mit einer Verringerung der Signalintensität -auch bei perfekt passenden Sequenzen- gerechnet werden, sodass wir zudem versuchten, dies durch eine mögliche Verlängerung der Sonden auszugleichen. Wie in Ergebnisteil 3.3 zu sehen, ist dies auch erfolgreich gelungen.

Nach unserem Wissen ist mit der Publikation des Microarrays „BaRes“ dies zum ersten Mal in einem peer-reviewed Journal veröffentlicht worden [9].

### 4.3 Microarray - Reproduzierbarkeit, Kinetik, Blind-Studie

#### 4.3.1 Differenzierungsfähigkeit

Die Differenzierungsfähigkeit der Microarrays gerade bei der Abfrage einzelner Nukleotide ist eine sehr komplexe Angelegenheit. Eine möglichst gleiche Hybridisierungsfähigkeit aller benutzten Sonden unter den angewandten experimentellen Bedingungen ist unausweichlich. Somit sind nicht nur sondenspezifische Parameter wie Sekundärstruktur [99] oder Schmelztemperatur wichtig, sondern auch die Sequenzabfolge [137] und Fragmentlänge [85] der Ziel-DNA, die Immobilisierungsstrategie, die Hybridisierungs- und Waschbedingungen sowie die Hybridisierungsdauer [68]. Trotzdem wurde bei den vorgestellten Microarrays erreicht, dass in einem Experiment 15

Nukleotidpositionen und bis zu zehn Gene gleichzeitig untersucht werden konnten.

Entsprechend der bekannten und zum Teil bereits angesprochenen Literatur verhielten sich auch die ausgewählten Sonden. So konnten starke Unterschiede bezüglich der Hybridisierungseffizienz beobachtet werden, was sich zum Beispiel in der absoluten Signalintensität widerspiegelt, welche sich in einem Bereich von 2000 - 20.000 bewegt. Dieses war erwartet worden, da bekannt ist, dass Sonden mit unterschiedlichen Sequenzen unterschiedliches Hybridisierungsverhalten [137, 138] zeigen. Jedoch konnten alle Perfect-Match-Sonden korrekt identifiziert werden, da nach vier Stunden Hybridisierung die Signalintensität der Mismatch-Sonden bezogen auf die dazugehörige Perfect-Match-Sonde nicht höher war als 45%. Dies konnte mit allen vorhanden Genotypen gezeigt werden. Während bei dem von uns gewählten Microarrayformat alle Sonden unter den gleichen Bedingungen hybridisiert werden, kann man bei anderen Methoden für jede Sonde spezifische Hybridisierungsbedingungen einstellen. Dies ist z.B. bei Microarrays möglich, die ein elektrisches Feld zur Kontrolle nutzen.

#### 4.3.2 Kinetik

Wie zuvor indirekt angesprochen ist die Hybridisierungszeit ein wichtiger Faktor für die Diskriminierung [68]. Dies liegt daran, dass die markierte Ziel-DNA zu den Sonden diffundieren muss. Ist die markierte DNA nun an den Sonden oder „Fänger-molekülen“ angelangt, so kann sie an diesen ankoppeln und wird dem System der flüssigen Phase bei der Hybridisierung entzogen. So können andere markierte Moleküle besser in der Flüssigkeit bewegt werden und zu den entsprechenden Sonden diffundieren.

Gleichzeitig sind die gebundenen DNA-Moleküle keinesfalls komplett dem System entzogen, sondern lösen sich vergleichbar einem Reaktionsgleichgewicht auch wieder ab. Somit ist mit Beginn der Hybridisierung ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität an den Sonden zu erwarten, welcher dann auf einem Intensitätsplateau gipfelt, das ein Indiz für ein mögliches Reaktionsgleichgewicht ist. Dies konnten wir sehr deutlich an dem Zeitverlauf der Signalintensität bei dem Microarraymodul „BaRes“ erkennen. Es wurde gezeigt, dass nach vier Stunden das Fluoreszenzintensitätsniveau nicht mehr ansteigt und sich somit ein Reaktionsgleichgewicht eingestellt hat. Bei dem Vergleich der Signalintensitäten der Replikate eines Arrays über die Zeit konnte man zusätzlich erkennen, dass sich schon nach zwei Stunden eine homogene Verteilung an markierter DNA auf der Arrayoberfläche gebildet hat und auch

die Signalintensitäten der Mismatch-Sonden sich einem Plateau annähern. Anhand dieser beiden Graphen lässt sich darlegen, wie schnell aufgrund von Diffusion eine homogene Verteilung der markierten DNA erfolgen kann.

Zusätzlich liest man am Grafen der Signalintensität über die Zeit ab (Abb. 3.19), dass der Punkt der Kurve, indem die Steigung gleich 1 ist bei 150 Minuten liegt. Ab diesem Zeitpunkt wird die Signalintensität dominiert vom Reaktionsgleichgewicht der gebundenen Moleküle. Auch das ist ein weiteres Indiz dafür, dass nach 120 bis 150 Minuten eine signifikant stärkere Diskriminierung der SONDENSÄTZE nicht mehr möglich ist, sondern nur noch eine geringfügige Steigerung der Signalintensität.

Damit ist die Schlussfolgerung möglich, dass sich das System ab einer Hybridisierungsdauer von vier Stunden in einem Gleichgewichtszustand befindet und eine längere Hybridisierungsdauer keine Veränderung außer den bestimmten bei der Reproduzierbarkeitstudie bestimmten Schwankungen ca. 12,5% liefert. Eine Hybridisierungsdauer von vier Stunden ist der konservative Ansatz eines Experiments. Die kürzstmögliche Zeit wurde als die Zeit definiert, bei der alle Perfect-Match-Sonden ein Signal-Rausch-Verhältnis von größer 3 aufwiesen. Dies war nach 60 Minuten gegeben. Alle Perfect-Match-Sonden wurden dabei korrekt identifiziert und die höchste Intensität einer Mismatch-Sonde wurde, bezogen auf die dazu gehörige Perfect-Match-Sonde, mit 0,53 festgehalten.

Dies wiederum zeigt, dass bereits nach 60 Minuten Hybridisierungsdauer ein korrektes Ergebnis zu erwarten ist, auch wenn die Diskriminierung der Nukleotide untereinander noch nicht die gleiche Qualität aufweist wie nach einer Hybridisierung von vier Stunden. Die erhaltenen Werte beziehen sich selbstverständlich nur auf das hier angewendete System. Ebenfalls entsprechen die Ergebnisse jedoch vom Prinzip her voll und ganz unseren Erwartungen, wenn auch die Schnelligkeit mit der eine korrekte Aussage erhalten werden konnte, uns überraschte und Diskussion mit Hinblick auf Sinn und Zweck automatisierter Hybridisiermaschinen zulässt.

### 4.3.3 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit korrekter Ergebnisse in der Analyse ist die wichtigste Voraussetzung für den Einsatz von einem Microarray als Diagnosewerkzeug. Ursachen für Schwankungen in den Ergebnissen sind in den Microarray-Experimenten zahlreich vorhanden, beginnend bei der Herstellung der Arrays über die PCR zur Amplifizierung der Zielgene bis hin zu den Unterschieden bezüglich der Hybridisierungseffizienz der Sonden unter den gegebenen Hybridisierungsbedingungen [15].



Bei Genexpressionsarrays gibt es bereits Studien bezüglich der Reproduzierbarkeit. So schwanken die Werte der Signalintensitäten innerhalb der Replikate bei gleichen Microarrays um 5 - 10% und bei unterschiedlich hergestellten Microarrays um 10 bis 30%. [142, 140, 56, 57, 84]. Leider sind vergleichbare Arbeiten bei diagnostischen Arrays zur Zeit noch nicht durchgeführt worden.

In dieser Studie wurde die Reproduzierbarkeit zweier verschiedener Ansätze untersucht. Zum einen die Reproduzierbarkeit des Hybridisierungs- und Waschschruttes, zum anderen des kompletten Assays, d.h. von Multiplex-PCR über den enzymatischen Einbau von Cy5-Nukleotiden bis hin zur Hybridisierung und zum Waschen des Slides. Zur Messung der Reproduzierbarkeit des Hybridisierungs- und Waschschruttes wurde dasselbe markierte PCR-Produkt auf drei unterschiedlichen Slides gleichzeitig hybridisiert und gewaschen. Bestimmt wurde die Reproduzierbarkeit durch den Vergleich der relativen Intensitäten der Mismatch-Sonden. Dabei zeigte sich, dass im Mittel eine Abweichung zwischen 2 Arrays von 12,5% (inter-array-Reproduzierbarkeit von 87,5%) vorliegt. Dies ist etwas höher als die bei Expressionsarray bekannten 5 bis 10% aber immer noch als auf dem gleichen Niveau anzusehen.

Bei der zweiten Reproduzierbarkeitsstudie wurde der komplette vorgestellte Assay untersucht und auf die Schwankungen der Intensitäten hin untersucht. Um die vollkommene Unabhängigkeit dieser drei Replikate zu gewährleisten, wurden aus derselben DNA drei unabhängige Multiplex-PCR gefolgt von drei Markierungsreaktionen durchgeführt. Die erhaltenen drei Produkte wurden dann auf unterschiedlichen Microarrays hybridisiert und gewaschen. Dabei zeigte sich, dass Schwankungen von durchschnittlich 13,5% auftreten können. Dies ist höher als bei Expressionsarrays und ebenfalls leichter erhöht als die inter-slide-spezifische Reproduzierbarkeit alleine. Aus diesem Ergebnis lässt sich zumindest das Indiz ableiten, dass die Multiplex-PCR mit dem enzymatischen Labelling unter den verwendeten Bedingungen als stabil angesehen werden kann.

Wenn man sich die absoluten Schwankungen bei beiden Studien zur Reproduzierbarkeit ansieht und die jeweils höchsten Abweichungen mit  $\pm 0,057$  bzw.  $\pm 0,058$  betrachtet, so hat man mit Schwankungen der relativen Intensität im Bereich von 1,2 zu rechnen. Dieser Wert liegt sehr nahe an dem Plateau, welches bei der Betrachtung der Variabilität der relativen Intensität des Mismatches mit 1,1 festgestellt wurde. Die Konkordanz der Daten stammt aus verschiedenen Versuchen mit verschiedenen Templates und verschiedenen Versuchsansätzen. Dies zeugt von einer

hohen Reproduzierbarkeit und lässt die nach einer Hybridisierung erhaltenen Daten als sehr verlässlich erscheinen.

Obwohl die hier vorgestellten diagnostischen Microarrays bezüglich ihrer Reproduzierbarkeit etwas schlechter einzustufen sind als Expressionsarrays, so ist sicherlich davon auszugehen, dass diese noch verbessert werden können, sofern man auf eine automatisierbare Hybridisierungs- und Wasch-Station zurückgreifen kann. Durch die maschinelle Unterstützung ist eine einheitlichere Handhabung möglich, welches sich dann auch in den Ergebnissen widerspiegeln sollte.

### 4.3.4 Blind-Studie mit „Ypres“ und *Y. enterocolitica*

Bei der Auswertung der Blind-Studie zeigten sich deutlich die Grenzen des Arrays und des Assays. Gerade an den Beispielen der nicht- oder falsch detektierten Isolate Nr.1 und Nr. 36 wird dies deutlich.

Bei Nr. 1 konnte eine vorhandene Streptomycinresistenz nicht nachgewiesen werden. Der bestätigte hohe MHK-Wert ( $<32\mu\text{g/ml}$ ) lässt ein vorhandenes Resistenzgen als sehr wahrscheinlich erscheinen. Eine chromosomal codierte Streptomycinresistenz basierend auf einer Punktmutation des Gens *rpsL* würde einen kleineren und klinisch nicht relevanten MHK-Wert hervorrufen. Fest steht, dass mit der vorhandenen Multiplex-PCR kein Amplifikat eines nachweisbaren Resistenzgens erhalten werden konnte.

Streptomycin ist ein Aminoglycosid und kann durch eine Vielzahl von Genprodukten modifiziert werden. Shaw *et al.* [134] veröffentlichte einen Übersichtsartikel bei dem beispielweise nur ein Gen beschrieben war (*ant3-Ia*), welches ein Enzym codiert, das adenylierend an der 3'-Position des Streptomycins wirkt. 2003 veröffentlichte Vakulenko [152], dass bereits acht solcher Gene beschrieben worden seien, von denen *ant3-Ia* mit 90% das am häufigsten vorkommende sei. Eine Homologie dieser Gene untereinander läge dabei zwischen 59 bis 95%. Somit kann es durchaus der Fall sein, dass ein Resistenzgen vorliegt, welches wir gar nicht detektieren konnten.

Eine Aufnahme aller für Streptomycin in Frage kommenden Resistenzgene in die Multiplex-PCR ist nicht möglich und die Variabilität der Sequenzen lässt auch keine gemeinsame Detektion durch konservierte Primer oder Sonden zu. Hier ist eine erste Grenze der DNA-basierten Detektion von aminoglykosid-modifizierenden Enzymen aufgetreten, auf die auch schon andere Arbeiten gestoßen sind. Bei diesen wurde ebenfalls eine Auswahl von Resistenzgenen getroffen und die Sonden wurden ausgewählt [36, 88, 145, 109, 111].

Bei einer klinischen Anwendung mit natürlichen Isolaten und unbekannten Resistenzgenen zeigte sich, dass der Assay nicht vollkommen ist. Andere sensiblere Detektionsmethoden, welche einen DNA-Anreicherungsschritt überflüssig erscheinen lassen oder aber eine Ligase-Reaktion, mit der es möglich ist, eine höhere Anzahl unterschiedlicher Amplifikationsprodukte in einer Reaktion zu markieren, könnten dieses Problem umgehen und die volle Multiplexfähigkeit eines diagnostischen Microarrays ausnutzen. Wie auch immer eine andere methodische, genotypische Variante aussähe, eine phänotypische Untersuchung des Organismus wäre von solchen Problemen nicht betroffen.

Isolat Nr. 36 besaß eine Mutation an einer Position, die nicht mit den vorhandenen Sonden erfasst werden konnte. Das liegt daran, dass für eine solche Mutation keine Sonden entwickelt wurden. Die dort beobachtete Mutation wurde noch in keiner Studie zuvor bei *Y. pestis* oder *Y. pseudotuberculosis* beobachtet. Aus diesem Grund wurden auch keine Sonden zum Nachweis dieser Mutation entwickelt und auf dem Microarray integriert. Der Microarray wurde speziell für *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* entwickelt und die Auswahl von *Y. enterocolitica*-Stämmen für diese Blind-Studie erfolgte nur deshalb, da keine klinisch resistente *Y. pestis* oder *Y. pseudotuberculosis*-Isolate vorhanden waren. Obwohl bereits vorher bekannt war, dass bei *Y. enterocolitica* unterschiedliche Aminosäureaustausche beobachtet wurden als bei *Y. pestis*, wurde entschieden, die Versuchsreihe trotzdem durchzuführen.

An diesem Beispiel wird deutlich, wie spezifisch ein solcher Microarray ist. Wir haben uns bewusst dafür entschieden nicht *Y. enterocolitica*- Mutationen mit aufzunehmen, sondern uns nur auf den hochpathogenen Organismus *Y. pestis* zu beschränken. Da dieser in den berücksichtigten Gensequenzen identisch mit *Y. pseudotuberculosis* ist, konnte eine Isolation von Mutanten und somit eine Evaluation des Arrays auch mit dieser Spezies erfolgen. Dass eine dabei erfolgte Hybridisierung mit *Y. enterocolitica* auch erfolgreich war, ließ trotz der vorhandenen Nukleotidunterschiede eine solche Blindstudie erst möglich erscheinen. Stets mit dem dabei vorhandenen Wissen, möglicherweise nicht-detektierbare Mutationen in der Auswahl zu finden.

Durch die Auswahl von klinischen Isolaten, die phänotypisch gemäß klinisch relevanter Richtwerte als resistent, sensibel oder intermediär eingestuft waren, lässt sich des Weiteren eine sehr wichtige Feststellung in Bezug auf DNA-Diagnostik und der Vorhersage von Quinolon-Resistenzen aufzeigen. Keiner der ausgewählten Stämme zeigte phänotypisch eine klinisch relevante Resistenz gegen Ciprofloxacin gemäß den

US-amerikanischen CLSI-Standards. Bei Nalidixin trat jedoch eine solche auf. Ciprofloxacin ist -vereinfacht ausgedrückt- ein fluoriertes Nalidixin. Resistenzen gegen diese beiden Antibiotika beruhen auf denselben Punktmutationen im Gen *gyrA*. Sollte also ein Isolat im Phänotypen eine Resistenz gegen diese Antibiotika aufweisen, sei sie klinisch relevant oder nicht, so sollte eine Punktmutation im Gen *gyrA* zu finden sein. Der Umkehrschluss ist dagegen nicht zwangsläufig möglich. Das Auftreten einer solchen Mutation lässt zwar eine Nalidixin- oder Quinolonresistenz vorhersagen, jedoch nicht zwangsläufig eine klinisch relevante Resistenz gegenüber dem Fluorochinolon Ciprofloxacin nach CLSI-Standards. Bestimmt man den MHK-Wert für Ciprofloxacin dieser Isolate, so ist er gegenüber dem des Wildtyps zwar erhöht, scheint jedoch klinisch nicht relevant. In diesem Fall würde ein Mediziner Ciprofloxacin sicherlich zur Medikation des Patienten in Betracht ziehen - zumal er vom untersuchenden Labor die Rückmeldung bekommen würde, dass der Organismus Ciprofloxacin-sensibel sei.

Dieses Problem haben bis jetzt alle auf DNA basierenden Methoden zu verzeichnen. Hurtle und Lindler isolierten Mutanten mit  $\text{MHK}_{CIP}$ -Werten zwischen 0,5 und  $4\mu\text{g/ml}$  [91, 79]. Nach den CLSI-Standards gelten unter einem  $\text{MHK}_{CIP}$ -Wert von  $2\mu\text{g/ml}$  alle Isolate als sensibel. Eine eindeutige Vorhersage bezüglich der klinischen Relevanz der CIP-resistenten Mutanten wäre somit auch bei Hurtle nicht möglich. Jedoch sollte allein schon nach biologischem Verständnis davon abgeraten werden Ciprofloxacin als Antibiotikum der Wahl einzusetzen, wenn bereits bekannt ist, dass eine Mutation vorliegt, welche den MHK-Wert von Quinolonen erhöht. Nach EUCAST-Richtlinien ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)), liegen die MHK-Werte für Ciprofloxacin ab  $0,5\mu\text{g/ml}$  zudem nicht mehr im sensiblen Bereich. Somit besteht nach diesen EU-Richtlinien eine klinische Relevanz, die mit Hilfe von genotypischen Methoden vorhersagbar ist.

Die Blind-Studie sollte als ein Modellversuch bewertet werden. Mit ihr sollte ein Einblick gewagt werden, in wie weit korrekte Ergebnisse mit unbekannten Stämmen erhalten werden können. Um eine verlässliche Spezifität oder Sensitivität messen zu können, ist die Anzahl an untersuchten Isolaten zu gering. Desweiteren wurde auch mit einem Organismus gearbeitet, für den dieser Microarray nicht entwickelt worden war. Trotzdem kann uns diese Studie Hinweise auf eine mögliche Verlässlichkeit des Assays und/oder Arrays unter realen Bedingungen geben. Unter realen Einsatzbedingungen ist es möglich mit Hilfe der mit dem Microarray gewonnen Ergebnissen den Phänotyp eines Isolats korrekt vorherzusagen. Dies muss nicht zu 100% korrekt

sein, jedoch ist es mit einer Wahrscheinlichkeit von 94,8% eine richtige Bestimmung. Aber wie bereits erwähnt, stammt diese Zahl nur aus einer kleinen Stichprobe.

## 4.4 Mutationen und Mutanten

### 4.4.1 *Bacillus*

Rifampicin-Resistenzen bei *B. anthracis* wurden bereits ausgiebig von Vogler *et al.* untersucht [154]. Dabei zeigte sich, dass acht Nukleotidpositionen im Gen *rpoB* als relevant anzusehen sind Rifampicin-Resistenz zu vermitteln. Vogler *et al.* selektionierten dazu 20 unabhängige Mutanten und erhielten dabei acht verschiedene Genotypen [154]. Dabei traten an drei Positionen Mutationen verstärkt auf. Alle anderen Positionen - so lässt sich rechnerisch aus dem Paper ermitteln - traten jedoch nur einmal auf. Diese weniger häufig auftretenden Mutationen wurden bei uns nicht beobachtet, obwohl die Anzahl an unabhängig selektionierten Mutanten in dieser Arbeit mit 34 fast doppelt so hoch liegt als bei Vogler *et al.*, gleichwohl es sich auch bei dieser Anzahl nur um eine kleine Stichprobe handelt. Abbildung 4.1 zeigt eine aktualisierte Übersicht über alle bekannten Mutationen im *rpoB* Cluster I von *Bacillus anthracis* und *Bacillus cereus*.

Vergleicht man die Häufigkeitsverteilung (Abb. 4.2) so stellt man fest, dass diese *B. anthracis* mehr ähnelt als der Häufigkeitsverteilung Voglers *et al.* bei *B. cereus* ATCC14579. Gleichzeitig trat auch eine Mutation auf (*rpoB* C1443 T), welche bis jetzt nur bei dem nahen Verwandten *B. anthracis* beobachtet wurde, nicht jedoch bei *B. cereus*. Dies kann man sicherlich auch auf die kleine Stichprobe von gewonnenen Isolaten zurückführen, doch verbunden ist dieses Ergebnis sicherlich auch mit dem nahen Verwandtschaftsgrad der Spezies innerhalb der *B. cereus*-Gruppe [118, 120, 82, 105, 86].

Bei Isolaten, welche aus der Umwelt entnommen und isoliert wurden, verschwimmen die Grenzen der Speziesdifferenzierung noch mehr. Dies wurde zum einen in dieser Arbeit deutlich anhand der erhaltenen Sequenzen der *rpoB*-Gene der Umweltprobe, als auch schon bei Rasko *et al.*, der die These unterstützt, dass es sich bei *B. cereus*, *B. anthracis* und *B. thuringiensis* um eine Spezies handelt [118]. Neue bei Affen isolierte Bakterien lassen sich zum Beispiel nicht eindeutig der Spezies *B. anthracis* oder *B. cereus* zuordnen [87]. Für eine genotypische Diagnostik im Hinblick auf eine Rifampicin-Resistenz ist es jedenfalls nicht nur sinnvoll, mögliche

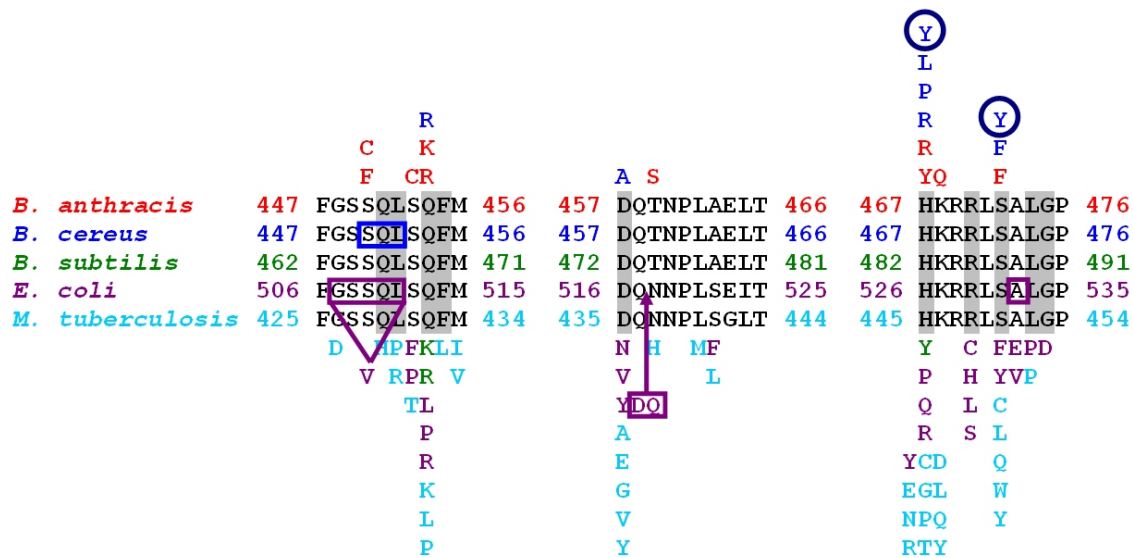


Abb. 4.1: (verändert nach Vogler, Campbell): Übersicht über beschriebene Mutanten im *rpoB* cluster I in verschiedenen Spezies: *B. anthracis* (rot), *B. cereus* (blau), *B. subtilis* (grün), *E. coli* (violett), *M. tuberculosis* (hellblau). Deletionen sind innerhalb einer Box und verbunden mit einer beliebigen Aminosäure (z.B. V bei *E. coli*). Insertionen (DQ) sind mit einem einfügenden Pfeil gekennzeichnet. Aminosäuren, welche direkt mit RIF interagieren sind schattiert dargestellt. Die neu beschriebene Mutation S 472 Y ist umkreist.

Mutationen solcher naher verwandter Spezies in die Diagnose mit aufzunehmen. Im Vergleich zu anderen Spezies wie *M. tuberculosis* kann man davon ausgehen, dass bis jetzt nur ein kleiner Teil an auftretenden Mutationen in *Bacillus* spec. erkannt worden sind und in der Umwelt sicherlich auch noch weitere bisher unbekannte Mutationen existieren.

Bei Vogler *et al.* bestand die Verifizierung der erhaltenen Mutanten für *B. cereus* und *B. anthracis* darin, Literaturvergleiche mit *B. subtilis*, *M. tuberculosis* und *E. coli* durchzuführen [154]. Die Tatsache, dass an vergleichbaren Positionen dieselben Aminosäureaustausche stattfanden genügten Vogler *et al.* als Beweis. In dieser Arbeit wurde über diesen Beweis hinaus zusätzlich für die noch nicht in *Bacillaceae* beschriebene Mutation *rpoB* C1459A in *B. cereus* eine sensible Revertante durch wiederholende Isolation und Resistenztestung gesucht und gefunden. Diese wies sowohl den Phänotypen als auch den Genotypen des Wildstammes auf und lässt somit tatsächlich den hypothetisch Schluss zu, dass allein die aufgetretene Mutation den Phänotypen verursacht. Dies wurde von Vogler *et al.* so nicht

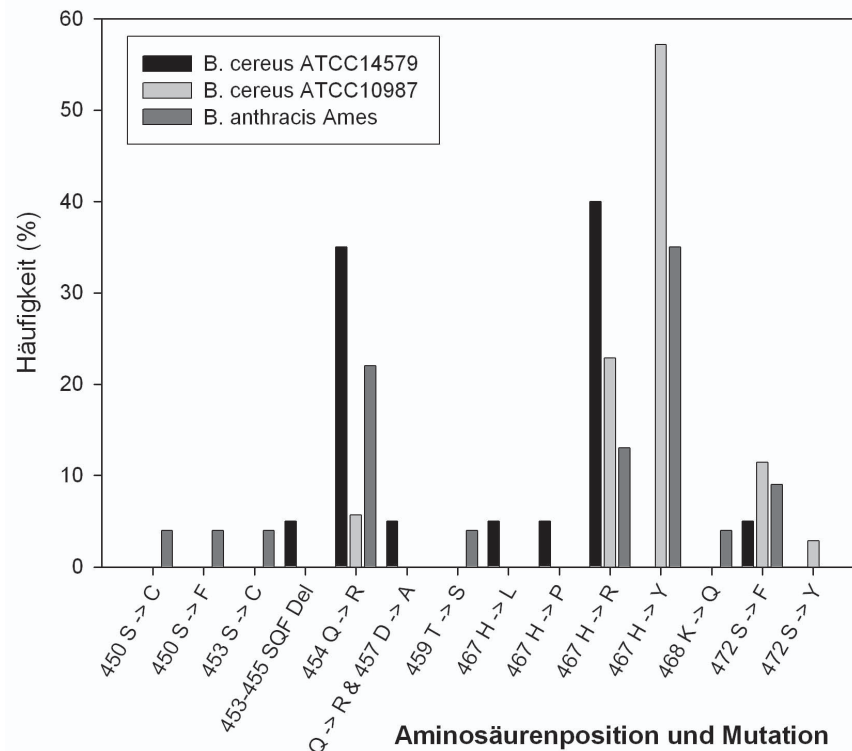


Abb. 4.2: Häufigkeitsverteilung der aufgetretenen Rif-resistenten Mutanten. Vergleich der Stämme *B. cereus* ATCC14579, *B. cereus* ATCC10987 und *B. anthracis*. Daten von *B. cereus* ATCC14579 und *B. anthracis* stammen von Vogler *et al.*[154].

vollzogen [154]. Weder durch Selektion einer sensiblen Revertante, noch über beispielsweise site-directed mutagenesis mit anschließender homologer Rekombination. Trotzdem soll hiermit nicht das Ergebnis Voglers in Frage gestellt werden, sondern nur die Argumentation kritisch betrachtet werden. Zumindest beim Auftreten von Mutationen in neuen Gattungen sollte man erneut einen solchen Beweis führen und sich nicht nur auf Homologien von Genen und Proteinen verlassen, auch wenn dies manch langwierige Laborarbeit abnehmen würde.

Die Untersuchungen der isolierten CIP-resistenten *Bacillus*-Mutanten zeigten ein vergleichbares Bild mit den Ergebnissen von Athamna, Bast und Price [10, 11, 115]. Die zuerst beobachteten Mutationen treten in Gen *gyrA* auf bei einem MHK-Wert von 4 µg/ml. Dies ist konkordant zu den Ergebnissen der anderen Studien, jedoch konnten wir nur Mutationen an der Position *gyrA254* beobachten, was sicherlich auf den kleinen Stichprobenumfang zurückgeführt werden kann. Bei erhöhter Resis-

tenz ( $\text{MHK} \geq 63\mu\text{g/ml}$ ) wurden wie bei Price und Athamna zusätzlich Mutationen im Gen *parC* beobachtet [10, 115]. Mutationen in dem Gen *gyrB* konnten nicht beobachtet werden.

Das Vorhandensein von Transportersystemen bei hochresistenten Mutanten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen bei Price *et al.* zeigten dass, sich durch Zugabe von Reserpin, welches Multidrug-Transporter hemmt, der MHK-Wert von Ciprofloxacin *in vitro* um bis zu 4 Stufen herabsenken lässt [115]. Genauere Untersuchungen hinsichtlich der Transporter wie bei *E.coli* oder *S. aureus* sind uns jedoch nicht bekannt. Für den Microarray und die Diagnostik sehen wir allerdings die Aussagekraft nicht weiter gefährdet, da der Effekt der Herabsenkung des MHK Wertes (I) nur bei Isolaten mit einer „high-level“ Resistenz beobachtet wurden und (II) selbst nach Absenkung des MHK Wertes dieser bei  $4\mu\text{g/ml}$  lag und damit noch als klinisch relevant anzusehen ist.

### 4.4.2 Yersinia

Bei der Untersuchung der isolierten CIP-resistenten *Yersinia*-Mutanten zeigte sich ein zu erwartendes Spektrum. Zwar ist unseres Wissens nach noch keine Studie zum Auftreten von CIP-Resistenz vermittelnden Mutationen in *Y. pseudotuberculosis* veröffentlicht worden, doch lassen ähnliche Untersuchungen bei *Y. pestis* und *Y. enterocolitica* darauf schließen. Es wurden drei verschiedene Genotypen isoliert, welche an der AS-Position GyrA 81, 83 und 87 auftreten. Dabei handelt es sich um bekannte Positionen, welche bei einem breiten Spektrum von Erregern der *Enterobacteriaceae* in klinischen Isolaten auftraten.

Das Auftreten von Mutationen an AS-Position 82 dagegen ist nicht so häufig, jedoch beschrieben [52]. Dabei handelt es sich im Allgemeinen um den Austausch der Aminosäure Asp  $\rightarrow$  Gly. Hervorgerufen wird dieser Austausch durch eine Punktmutation des Nukleotids *gyrA* 245. In unserem Fall beobachteten wir jedoch bei zwei Isolaten eine Punktmutation des Nukleotids *gyrA* 244, welches den Aminosäureaustausch Asp  $\rightarrow$  Asn bewirkt. Diese Mutation ist bis jetzt noch nicht innerhalb der Gattung *Yersinia* beschrieben worden und wurde innerhalb der Gruppe der *Enterobacteriaceae* bislang nur einmal bei *Salmonella* [52] beobachtet.

Da diese Mutation nur aus einer anderen Gattung her bekannt ist, wurde auch hier eine sensible Revertante isoliert und somit die Abhängigkeit der Mutation mit dem Phänotypen nachgewiesen. Abbildung 4.3 zeigt eine aktuelle Übersicht über die bis jetzt beschriebenen Cip-Resistenz vermittelnden und beschriebenen Mutationen





bereits in dieser Arbeit isoliert und ermöglichen somit einen schnelleren Einstieg in die Entwicklungsphase für mögliche Sonden.

Bei dieser Arbeit wurden resistente *B. cereus* ATCC10987 und *Y. pseudotuberculosis* DSM8992 auf zwei unterschiedliche Arten hin isoliert. Dies geschah auf einfache Art und Weise, ähnlich mögliche Bioterroristen vorgehen könnten. Dies geschah jedoch nicht, um eine mögliche Anleitung hierzu zu geben, sondern um Positivkontrollen zur späteren Evaluation des Microarrays zu erhalten. Die erhaltenen Genotypen weisen zwar nicht das komplette Spektrum der bisher beobachteten Resistenz-vermittelnden Mutationen auf, ein repräsentativer Teil des Ganzen ist es trotzdem, zumal auch jeweils eine für *Bacillus* und *Yersinia* noch nicht beschriebene Mutation isoliert und charakterisiert werden konnte.

### 4.5 Datenbank

Die graphische Benutzeroberfläche ermöglicht es, sich schnell innerhalb des Programms zurechtzufinden und alle relevanten Daten schnell und übersichtlich zu ordnen. Durch das Einbringen einer auf Excel basierten Auswerterroutine ist die Datenbank schnell für unterschiedliche Systeme einsetzbar und unterstützt die Auswertung der Hybridisierung. Ausgelegt ist diese Datenbank bereits für 2-Farbenexperimente, wenn auch hier in unserem Fall nur mit einem Farbstoff (Cy5) gearbeitet wurde. Automatisch werden hier die Daten von GenePixPro ausgewertet und somit bildet diese Datenbank das ideale *add-on* für die Entwicklung von diagnostischen Microarrays im Laboralltag.

### 4.6 Fazit und Ausblick

Mit dieser Arbeit wurden die zwei Microarrayanwendungen „BaRes“ und „YpRes“ entwickelt, welche es ermöglichen im Labor innerhalb eines Tages eine genotypische Resistenzbestimmung durchzuführen. Die Schnelligkeit der Diagnostik ist bei Infektionen von enormer Wichtigkeit [12] und die beiden zeitintensivsten Schritte sind sicherlich die Amplifizierung der DNA und die Hybridisierung als solche.

Ein erster möglicher Angriffspunkt für weitere Untersuchungen bietet die Probenaufarbeitung. Zur Zeit dient als Ausgangsmaterial eine Reinkultur des Isolats. Dies ist sicherlich nicht immer der Fall. Dort gilt es verschiedene Möglichkeiten und Präparationen näher zu betrachten und gegebenenfalls für sich zu adaptieren. Dies

geschah nicht während dieser Arbeit, sollte jedoch auch nicht in dieser Arbeit untersucht werden. Hier lag das Augenmerk auf der Entwicklung von Microarray-Sonden, Amplifizierungs- und Markierungsreaktion.

Das Problem der Amplifizierung mittels PCR und die damit verbundenen benötigte Zeit ist eindeutig an die Sensitivität des Microarrays gebunden. Wäre es möglich mit weniger DNA-Material ein stärkeres Signal mit gleichbleibender Spezifität zu erhalten, könnte der durchgeführte Amplifikationsschritt entfallen. Aufgrund der Natur der DNA-Hybridisierung und der Sondenart ist dies jedoch nicht durchführbar.

Der alleinige Ansatz einer Multiplex-PCR um Resistenzen nachzuweisen würde nicht ausreichen, da Resistenz-vermittelnde Punktmutationen nicht erkannt würden. Hier müsste sich eine Sequenzierung anschließen, welche deutlich mehr Zeit in Anspruch nähme, als eine Hybridisierung auf einem Microarray. Ebenfalls der Einsatz einer Real-Time PCR wäre allenfalls konkurrenzfähig, jedoch nicht zwangsläufig besser. Zwar ist deren Sensitivität sicherlich um einiges besser im Vergleich zu der hier vorgestellten Multiplex-PCR, doch die Anzahl der untersuchten Gene und Nukleotidabfragen, oder einfach ausgedrückt, die Multiplex-Fähigkeit des Systems ist bei einer quantitativen PCR im Vergleich zu einem Microarray-Assay deutlich begrenzt. Sollte hier die Möglichkeit in naher Zukunft entstehen dieses Zeitintensive Problem zu umgehen - sei es durch zeitliche Verkürzung der DNA Amplifikation oder durch eine sensiblere Detektion - so sollte dies dann keine Frage mehr darstellen.

Die zeitliche Festlegung der Hybridisierung auf vier Stunden ist auf die Art der Hybridisierung zurückzuführen. Bei der hier verwendeten Methode mit einer feuchten Kammer in einem Wasserbad bewegen sich die markierten DNA Moleküle allein durch Diffusion. Eine aktive Fluidik im Hybridisierungssystem könnte die Zeit durchaus reduzieren. Durch den Einsatz von Hybridisiermaschinen mit einer aktiven Fluidik, sei es alternierendes Pumpen der Flüssigkeit (Tecan) oder einer zirkulierenden Flüssigkeitsstrom über der Oberfläche (memorec), lässt sich die Hybridisierungszeit für Expressionsarrays von 24 auf vier Stunden reduzieren. Übertragen auf diagnostische Arrays wäre eine dann notwendige Hybridisierungszeit mit einer solchen Maschine von 30min durchaus denkbar.

Eine andere Alternative bietet der Umstieg auf eine andere Art von Microarray. Elektronische Microarrays sollten eine Hybridisierung deutlich schneller ermöglichen. Dabei wird elektrischer Strom benutzt, um die DNA-Moleküle innerhalb der Flüssigkeit aktiv zu bewegen. Gleichzeitig soll innerhalb von fünf Minuten die Möglichkeit

bestehen, bereits eine Punktmutation eindeutig erkennen zu können und ein Ergebnis zu erhalten. Die Möglichkeit, diese Art von Microarray mehrfach zu verwenden, rückt auch den Betrag der Kosten pro Untersuchung ins Blickfeld. Im Ernstfall sollte sicherlich nicht ein mögliches Leben oder die Schmerzen eines Infizierten gegen die Untersuchungskosten abgewogen werden, jedoch für eine routinemäßige Anwendung mit anderen Fragestellungen wäre es durchaus angemessen fluoreszenzbasierende Glasmikroarrays mit alternativen Labellingmethoden oder anderen alternativen Multiplexmöglichkeiten kritisch in Betracht zu ziehen.

Neben dem Einsatz in der klinisch-bakteriologischen Diagnostik ist auch der Einsatz in der Kriminologie durchaus denkbar. Dort erlauben die entwickelten Microarrays bei bioterroristischen Anschlägen eine Genotypisierung des Erregers mit deren Hilfe man sogar die Herkunft des Stammes zurückverfolgen könnte.

Besonders betrachten muss man gerade vor einem Bioterror-relevanten Hintergrund die Aktualität des Microarrays. Ein Microarray kann mit seinen Sonden nur bekannte Nukleotidsequenzen abfragen. Zusätzlich aufgetretene - künstliche oder natürliche - Mutationen werden nicht entdeckt. Vielleicht hat man Glück wie in der Blindstudie beobachtet und die Sonden einer Position verhalten sich nicht wie erwartet, aber darauf sollte man sich nicht verlassen. Das Problem der Aktualität weisen alle Methoden auf, welche genotypisch nach Punktmutationen suchen wollen und dabei nicht auf die zeitintensive Sequenzierung zurückgreifen wollen. Die so erhaltene Sequenzinformation bilden die Grundlage für eine genotypische Untersuchung: Zuerst die Sequenz, dann eine schnelle Diagnostik. Untersuchungen und das Einbringen von künstlichen Mutationen an vorrausberechneten Stellen wie bei Hurtle *et al.* [79] sind dabei sicherlich hilfreich.

Ein weiteres zeitliches Problem ist sicherlich auf dem Weg zwischen Patient und Untersuchungsort der Probe zu sehen [106]. Dieses eigentlich scheinbar lösbare Problem erweist sich schon im normalen Klinikalltag als störend und als nicht immer behebbar. Aber was ist, wenn ein Patient erst gar nicht in ein Krankenhaus innerhalb kurzer Zeit verlegt werden kann? Was ist, wenn trotzdem eine solche Diagnose schnell erfolgen muss? Hier ist wohl nur eine Lösung zu nennen: Die Diagnostik muss zum Patienten. Und da ist auch wieder die Möglichkeit des Einsatzes von Microarrays und anderen kleinen handlichen multiplexfähigen Diagnostikgeräten zu sehen: Die „point - of - care“-Diagnostik mit dem Ziel schnell zu sein: Schnell beim Patienten und schnell in der Diagnostik. Denn „...*speed is the essence when one deals with bacterial infections.*“ [13]

# Literaturverzeichnis

- [1] M. Achtman, G. Morelli, P. Zhu, T. Wirth, I. Diehl, B. Kusecek, A. J. Vogler, D. M. Wagner, C. J. Allender, W. R. Easterday, V. Chenal-Francisque, P. Worsham, N. R. Thomson, J. Parkhill, L. E. Lindler, E. Carniel, and P. Keim. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(51):17837–42, 2004. 0027-8424 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [2] M. Achtman, K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24):14043–8, 1999. 0027-8424 Journal Article.
- [3] J. Adamczyk, M. Hesselsoe, N. Iversen, M. Horn, A. Lehner, P. H. Nielsen, M. Schlöter, P. Roslev, and M. Wagner. The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Appl Environ Microbiol*, 69(11):6875–87, 2003. 0099-2240 (Print) Evaluation Studies Journal Article.
- [4] Y. Agerso, L. B. Jensen, M. Givskov, and M. C. Roberts. The identification of a tetracycline resistance gene *tet(M)*, on a *Tn916*-like transposon, in the *Bacillus cereus* group. *FEMS Microbiol Lett*, 214(2):251–6, 2002. 0378-1097 Journal Article.
- [5] R. I. Aminov, J. C. Chee-Sanford, N. Garrigues, B. Teferedegne, I. J. Krapac, B. A. White, and R. I. Mackie. Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 68(4):1786–93, 2002. 0099-2240 (Print) Evaluation Studies Journal Article.

- [6] R. I. Aminov, N. Garrigues-Jeanjean, and R. I. Mackie. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol*, 67(1):22–32, 2001. 0099-2240 Evaluation Studies Journal Article Validation Studies.
- [7] K. K. Amoako, T. Prysliak, A. A. Potter, S. K. Collinson, W. W. Kay, and B. J. Allan. Attenuation of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain due to a mutation in the *rpsL* gene. *Avian Dis*, 48(1):19–25, 2004. 0005-2086 (Print) Journal Article.
- [8] Anonymous. Bekanntmachung des Robert Koch-Instituts Ratgeber:Milzbrand (Anthrax). *Bundesgesundheitsblatt*, 44:1228–1230, 2001.
- [9] M. H. Antwerpen, M. Schellhase, E. Ehrentreich-Forster, F. Bier, W. Witte, and U. Nübel. DNA microarray for detection of antibiotic resistance determinants in *Bacillus anthracis* and closely related *Bacillus cereus*. *Mol Cell Probes*, doi:10.1016/j.mcp.2006.10.002, 2006. 0890-8508 (Print) Journal article.
- [10] A. Athamna, M. Athamna, N. Abu-Rashed, B. Medlej, D. J. Bast, and E. Rubinstein. Selection of *Bacillus anthracis* isolates resistant to antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 54(2):424–8, 2004. 0305-7453 Journal Article.
- [11] D. J. Bast, A. Athamna, C. L. Duncan, J. C. de Azavedo, D. E. Low, G. Rahav, D. Farrell, and E. Rubinstein. Type II topoisomerase mutations in *Bacillus anthracis* associated with high-level fluoroquinolone resistance. *J Antimicrob Chemother*, 54(1):90–4, 2004. 0305-7453 Journal Article.
- [12] M. G. Bergeron. Genetic tools for the simultaneous identification of bacterial species and their antibiotic resistance genes: impact on clinical practice. *Int J Antimicrob Agents*, 16(1):1–3, 2000. 0924-8579 (Print) Journal Article Review.
- [13] M. G. Bergeron and M. Ouellette. Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, 36(8):2169–72, 1998. 0095-1137 (Print) Journal Article Review.

- [14] F. F. Bier and F. Kleinjung. Feature-size limitations of microarray technology—a critical review. *Fresenius J Anal Chem*, 371(2):151–6, 2001. 0937-0633 (Print) Journal Article Review.
- [15] L. Bodrossy. Diagnostic oligonucleotidemicroarrays for microbiology. In E. Blalock, editor, *A Beginner's Guide to Microarrays*, pages 43–92. Kluwer Academic Publishers, New York, 2003.
- [16] S. K. Bohlander, r. Espinosa, R., M. M. Le Beau, J. D. Rowley, and M. O. Diaz. A method for the rapid sequence-independent amplification of microdissected chromosomal material. *Genomics*, 13(4):1322–4, 1992. 0888-7543 (Print) Journal Article.
- [17] S. A. Booth, M. A. Drebot, I. E. Martin, and L. K. Ng. Design of oligonucleotide arrays to detect point mutations: molecular typing of antibiotic resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* and hantavirus infected deer mice. *Mol Cell Probes*, 17(2-3):77–84, 2003. 0890-8508 Journal Article.
- [18] P. Bossi, A. Tegnell, A. Baka, F. Van Loock, J. Hendriks, A. Werner, H. Maidhof, and G. Gouvras. Bichat guidelines for the clinical management of anthrax and bioterrorism-related anthrax. *Euro Surveill*, 9(12):E3–4, 2004. 1560-7917 (Electronic) Journal Article.
- [19] P. Bossi, A. Tegnell, A. Baka, F. Van Loock, J. Hendriks, A. Werner, H. Maidhof, and G. Gouvras. Bichat guidelines for the clinical management of plague and bioterrorism-related plague. *Euro Surveill*, 9(12):E5–6, 2004. 1560-7917 (Electronic) Journal Article.
- [20] D. D. Bowtell. Options available—from start to finish—for obtaining expression data by microarray. *Nat Genet*, 21(1 Suppl):25–32, 1999. 1061-4036 (Print) Journal Article Review.
- [21] L. Brakier-Gingras and P. Phoenix. The control of accuracy during protein synthesis in *Escherichia coli* and perturbations of this control by streptomycin, neomycin, or ribosomal mutations. *Can J Biochem Cell Biol*, 62(5):231–44, 1984. 0714-7511 (Print) Journal Article Review.
- [22] I. Braveny and G. Maschmeyer. *Infektionskrankheiten*. medeco Verlag GmbH, München, 2002.

- [23] I. Brook. The prophylaxis and treatment of anthrax. *Int J Antimicrob Agents*, 20(5):320–5, 2002. 0924-8579 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [24] P. O. Brown and T. D. Shalon. Methods for fabricating microarrays of biological samples, 1998.
- [25] A. Bryan, N. Shapir, and M. J. Sadowsky. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol*, 70(4):2503–7, 2004. 0099-2240 (Print) Comparative Study Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [26] A. Bryskier. *Bacillus anthracis* and antibacterial agents. *Clin Microbiol Infect*, 8(8):467–78, 2002. 1198-743X (Print) Journal Article Review.
- [27] C. Buchrieser, C. Rusniok, L. Frangeul, E. Couve, A. Billault, F. Kunst, E. Carniel, and P. Glaser. The 102-kilobase *pgm* locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Infect Immun*, 67(9):4851–61, 1999. 0019-9567 (Print) Comparative Study Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [28] J. E. Burton, O. J. Oshota, E. North, M. J. Hudson, N. Polyanskaya, J. Brehm, G. Lloyd, and N. J. Silman. Development of a multi-pathogen oligonucleotide microarray for detection of *Bacillus anthracis*. *Mol Cell Probes*, 19(5):349–57, 2005. 0890-8508 (Print) Evaluation Studies Journal Article.
- [29] L. Bush, J. Malecki, S. Wiersma, K. Cahill, R. Fried, M. Grossman, and W. Borkowsky. Update: Investigation of Bioterrorism-Related Anthrax and Interim Guidelines for Exposure Management and Antimicrobial Therapy, October 2001 . *MMWR*, 50:909–919, 2001.
- [30] D. R. Call, M. K. Bakko, M. J. Krug, and M. C. Roberts. Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(10):3290–5, 2003. 0066-4804 Journal Article.
- [31] E. A. Campbell, N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, and S. A. Darst. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 104(6):901–12, 2001. 0092-8674 Journal Article.



- [32] S. Capilla, J. Ruiz, P. Goni, J. Castillo, M. C. Rubio, M. T. Jimenez de Anta, R. Gomez-Lus, and J. Vila. Characterization of the molecular mechanisms of quinolone resistance in *Yersinia enterocolitica* O:3 clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, 53(6):1068–71, 2004. 0305-7453 (Print) Journal Article.
- [33] E. Carniel. Plasmids and pathogenicity islands of *Yersinia*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 264(1):89–108, 2002. 0070-217x Journal Article Review Review, Tutorial.
- [34] K. C. Carter. The Koch-Pasteur dispute on establishing the cause of anthrax. *Bull Hist Med*, 62(1):42–57, 1988. 0007-5140 (Print) Biography Historical Article Journal Article.
- [35] CDC. Investigation of bioterrorism-related anthrax and adverse events from antimicrobial prophylaxis. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*, 50:973–976, 2001.
- [36] S. Chen, S. Zhao, P. F. McDermott, C. M. Schroeder, D. G. White, and J. Meng. A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Mol Cell Probes*, 19(3):195–201, 2005. 0890-8508 (Print) Journal Article.
- [37] K. H. Choi, J. B. Gaynor, K. G. White, C. Lopez, C. M. Bosio, R. R. Karkhoff-Schweizer, and H. P. Schweizer. A *Tn7*-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods*, 2(6):443–8, 2005. 1548-7091 (Print) Evaluation Studies Journal Article.
- [38] I. Chopra and M. Roberts. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(2):232–60; second page, table of contents, 2001. 1092-2172 (Print) Journal Article.
- [39] G. Cornelis. The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol*, 291:455–62, 2002.
- [40] G. R. Cornelis, A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M. P. Sory, and I. Stainier. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4):1315–52, 1998. 1092-2172 Journal Article Review Review, Academic.

- [41] M. Cronin, C. Miyada, M. Trulson, T. Gingeras, G. McGall, C. Robinson, and M. Oval. WO9743450 Hybridization assays on nucleotide arrays , 1997.
- [42] Z. L. Cui, F. X. Jing, Z. Y. Hu, Z. R. Wu, and J. L. Zhao. The use of gene chip in detecting *Mycobacterium tuberculosis* resistant to rifampin and isoniazid. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 27(7):439–41, 2004. 1001-0939 Journal Article.
- [43] J. Davies. Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes. *Science*, 264:375 – 382, 1994.
- [44] J. Davies. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In D. Chadwick and J. Goode, editors, *Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*. John Wiley Sons Ltd., New York, 1997.
- [45] V. M. D’Costa, K. M. McGrann, D. W. Hughes, and G. D. Wright. Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311(5759):374–7, 2006. 1095-9203 (Electronic) Journal Article.
- [46] V. J. Denef, J. Park, J. L. Rodrigues, T. V. Tsoi, S. A. Hashsham, and J. M. Tiedje. Validation of a more sensitive method for using spotted oligonucleotide DNA microarrays for functional genomics studies on bacterial communities. *Environ Microbiol*, 5(10):933–43, 2003. 1462-2912 (Print) Journal Article Validation Studies.
- [47] S. Denkin, D. Volokhov, V. Chizhikov, and Y. Zhang. Microarray-based *pncA* genotyping of pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol*, 54(Pt 12):1127–31, 2005. 0022-2615 (Print) Journal Article.
- [48] D. T. Dennis and J. M. Hughes. Multidrug Resistance in Plague. *N Engl J Med*, 337(10):702–704, 1997.
- [49] F. Depardieu, P. E. Reynolds, and P. Courvalin. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(1):7–18, 2003. 0066-4804 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [50] J. DeRisi. Amplification and Labelling of DNA. Technical report, University of California, 2000.

- [51] P. Dersch. Cloning of pBR322 into *Yersinia pseudotuberculosis* - Persönliche Mitteilung, 2005.
- [52] D. J. Eaves, E. Liebana, M. J. Woodward, and L. J. Piddock. Detection of *gyrA* mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol*, 40(11):4121–5, 2002. 0095-1137 (Print) Evaluation Studies Journal Article.
- [53] R. Ehricht, P. Slickers, S. Goellner, H. Hotzel, and K. Sachse. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes*, 20(1):60–3, 2006. 0890-8508 (Print) Evaluation Studies Journal Article.
- [54] M. Fines, B. Perichon, P. Reynolds, D. F. Sahm, and P. Courvalin. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(9):2161–4, 1999. 0066-4804 (Print) Journal Article.
- [55] G. Frech and S. Schwarz. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. *J Appl Microbiol*, 89(4):633–41, 2000. 1364-5072 (Print) Journal Article.
- [56] F. W. Frueh. Impact of microarray data quality on genomic data submissions to the FDA. *Nat Biotechnol*, 24(9):1105–7, 2006. 1087-0156 (Print) Journal Article.
- [57] F. W. Frueh, A. Rudman, K. Simon, S. Gutman, C. Reed, and A. J. Dornier. Experience with voluntary and required genomic data submissions to the FDA: summary report from track 1 of the third FDA-DIA-PWG-PhRMA-BIO pharmacogenomics workshop. *Pharmacogenomics J*, 6(5):296–300, 2006. 1470-269X (Print) Congresses.
- [58] D. J. Galas and E. W. Branscomb. Ribosome slowed by mutation to streptomycin resistance. *Nature*, 262(5569):617–9, 1976. 0028-0836 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov’t, Non-P.H.S.

- [59] M. Galimand, A. Guiyoule, G. Gerbaud, B. Rasoamanana, S. Chanteau, E. Carniel, and P. Courvalin. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *N Engl J Med*, 337(10):677–80, 1997. 0028-4793 Case Reports Journal Article.
- [60] G. M. Garrity. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, 2005.
- [61] A. E. Gill and S. G. Amyes. The contribution of a novel ribosomal S12 mutation to aminoglycoside resistance of *Escherichia coli* mutants. *J Chemother*, 16(4):347–9, 2004. 1120-009X (Print) Journal Article.
- [62] D. Gillespie and S. Spiegelman. A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J Mol Biol*, 12(3):829–42, 1965. 0022-2836 (Print) Journal Article.
- [63] P. H. Gilligan. Therapeutic challenges posed by bacterial bioterrorism threats. *Curr Opin Microbiol*, 5(5):489–95, 2002. 1369-5274 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [64] D. J. Graves, H. J. Su, S. E. McKenzie, S. Surrey, and P. Fortina. System for preparing microhybridization arrays on glass slides. *Anal Chem*, 70(23):5085–92, 1998. 0003-2700 (Print) Journal Article.
- [65] V. Grimm, S. Ezaki, M. Susa, C. Knabbe, R. D. Schmid, and T. T. Bachmann. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J Clin Microbiol*, 42(8):3766–74, 2004. 0095-1137 Journal Article.
- [66] G. Guillaume, V. Ledent, W. Moens, and J. M. Collard. Phylogeny of efflux-mediated tetracycline resistance genes and related proteins revisited. *Microb Drug Resist*, 10(1):11–26, 2004. 1076-6294 Journal Article.
- [67] A. Guiyoule, G. Gerbaud, C. Buchrieser, M. Galimand, L. Rahalison, S. Chanteau, P. Courvalin, and E. Carniel. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerg Infect Dis*, 7(1):43–8, 2001. 1080-6040 Journal Article.
- [68] Z. Guo, R. A. Guilfoyle, A. J. Thiel, R. Wang, and L. M. Smith. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligo-

- nucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res*, 22(24):5456–65, 1994. 0305-1048 (Print) Journal Article.
- [69] Z. Guo, Q. Liu, and L. M. Smith. Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphisms by artificial mismatch hybridization. *Nat Biotechnol*, 15(4):331–335, 1997. 1087-0156 (Print) Journal Article.
- [70] H. Hahn, D. Falke, S. Kaufmann, and U. Ullmann. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, 5th edition, 2004.
- [71] J. D. Hayes and C. R. Wolf. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem J*, 272(2):281–95, 1990. 0264-6021 (Print) Journal Article Review.
- [72] C. Heise. *Strukturierte Immobilisierung auf Oberflächen für Biochip-Anwendungen*. PhD thesis, Universität Potsdam, 2004.
- [73] E. Helgason, O. A. Okstad, D. A. Caugant, H. A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna, and Kolsto. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*, 66(6):2627–30, 2000. 0099-2240 (Print) Journal Article.
- [74] E. Helgason, N. J. Tourasse, R. Meisal, D. A. Caugant, and A. B. Kolsto. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol*, 70(1):191–201, 2004. 0099-2240 (Print) Evaluation Studies Journal Article.
- [75] J. A. Higgins, M. Cooper, L. Schroeder-Tucker, S. Black, D. Miller, J. S. Karns, E. Manthey, R. Breeze, and M. L. Perdue. A field investigation of *Bacillus anthracis* contamination of U.S. Department of Agriculture and other Washington, D.C., buildings during the anthrax attack of October 2001. *Appl Environ Microbiol*, 69(1):593–599, 2003. 0099-2240 (Print) Journal Article.
- [76] B. J. Hinnebusch, M. L. Rosso, T. G. Schwan, and E. Carniel. High-frequency conjugative transfer of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut. *Mol Microbiol*, 46(2):349–54, 2002. 0950-382X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t.
- [77] N. Honore and S. T. Cole. Streptomycin resistance in *Mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(2):238–42, 1994. 0066-4804 (Print) Comparative Study Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t.

- [78] D. Hooper. Mechanisms of Quinolone Resistance. In R. E. Hooper, DC., editor, *Quinolone Antimicrobial Agents*. ASM Press, Washington, D.C., 3rd edition, 2003.
- [79] W. Hurtle, L. Lindler, W. Fan, D. Shoemaker, E. Henschel, and D. Norwood. Detection and identification of ciprofloxacin-resistant *Yersinia pestis* by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol*, 41(7):3273–83, 2003. 0095-1137 (Print) Evaluation Studies Journal Article.
- [80] T. V. Inglesby, D. T. Dennis, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, A. M. Friedlander, J. Hauer, J. F. Koerner, M. Layton, J. McDade, M. T. Osterholm, T. O’Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, M. Schoch-Spana, and K. Tonat. Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Jama*, 283(17):2281–90, 2000. 0098-7484 Consensus Development Conference Guideline Journal Article Review.
- [81] T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. M. Friedlander, J. Hauer, J. McDade, M. T. Osterholm, T. O’Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, and K. Tonat. Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Jama*, 281(18):1735–45, 1999. 0098-7484 Consensus Development Conference Guideline Journal Article Practice Guideline Review.
- [82] N. Ivanova, A. Sorokin, I. Anderson, N. Galleron, B. Candelon, V. Kapatral, A. Bhattacharyya, G. Reznik, N. Mikhailova, A. Lapidus, L. Chu, M. Mazur, E. Goltsman, N. Larsen, M. D’Souza, T. Walunas, Y. Grechkin, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, S. D. Ehrlich, R. Overbeek, and N. Kyrpides. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 423(6935):87–91, 2003. 0028-0836 (Print) Comparative Study Journal Article Research Support, U.S. Gov’t, Non-P.H.S.
- [83] A. V. Ivshina, G. M. Vodeiko, V. A. Kuznetsov, D. Volokhov, R. Taffs, V. I. Chizhikov, R. A. Levandowski, and K. M. Chumakov. Mapping of genomic segments of influenza B virus strains by an oligonucleotide microarray method. *J Clin Microbiol*, 42(12):5793–801, 2004. 0095-1137 (Print) Evaluation Studies Journal Article.

- [84] H. Ji and R. W. Davis. Data quality in genomics and microarrays. *Nat Biotechnol*, 24(9):1112–3, 2006. 1087-0156 (Print) Journal Article.
- [85] J. J. Kelly, B. K. Chernov, I. Tovstanovsky, A. D. Mirzabekov, and S. G. Bavykin. Radical-generating coordination complexes as tools for rapid and effective fragmentation and fluorescent labeling of nucleic acids for microchip hybridization. *Anal Biochem*, 311(2):103–18, 2002. 0003-2697 (Print) Journal Article.
- [86] S. R. Klee, H. Nattermann, S. Becker, M. Urban-Schriefer, T. Franz, D. Jacob, and B. Appel. Evaluation of different methods to discriminate *Bacillus anthracis* from other bacteria of the *Bacillus cereus* group. *J Appl Microbiol*, 100(4):673–81, 2006. 1364-5072 (Print) Evaluation Studies Journal Article.
- [87] S. R. Klee, M. Ozel, B. Appel, C. Boesch, H. Ellerbrok, D. Jacob, G. Holland, F. H. Leendertz, G. Pauli, R. Grunow, and H. Nattermann. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d’Ivoire and Cameroon. *J Bacteriol*, 188(15):5333–44, 2006. 0021-9193 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t.
- [88] C. Levesque, L. Piche, C. Larose, and P. H. Roy. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(1):185–91, 1995. 0066-4804 Journal Article.
- [89] S. B. Levy, L. M. McMurry, T. M. Barbosa, V. Burdett, P. Courvalin, W. Hillen, M. C. Roberts, J. I. Rood, and D. E. Taylor. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(6):1523–4, 1999. 0066-4804 Journal Article.
- [90] M. Ligozzi, G. Lo Cascio, and R. Fontana. *vanA* gene cluster in a vancomycin-resistant clinical isolate of *Bacillus circulans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(8):2055–9, 1998. 0066-4804 Journal Article.
- [91] L. E. Lindler, W. Fan, and N. Jahan. Detection of ciprofloxacin-resistant *Yersinia pestis* by fluorogenic PCR using the LightCycler. *J Clin Microbiol*, 39(10):3649–55, 2001. 0095-1137 (Print) Evaluation Studies Journal Article.
- [92] D. M. Livermore. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother*, 41 Suppl D:25–41, 1998. 0305-7453 (Print) Journal Article Review.

- [93] F. Lorenzo-Diaz, T. Delgado, J. A. Reyes-Darias, C. Flores, S. Mendez-Alvarez, J. Villar, A. Sierra, and F. Claverie-Martin. Characterization of the first VanB vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in a Spanish hospital. *Curr Microbiol*, 48(3):199–203, 2004. 0343-8651 (Print) Journal Article.
- [94] M. Madigan, J. Martinko, and J. Parker. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, 9th edition edition, 2000.
- [95] J. Marmur and P. Doty. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol*, 3:585–94, 1961. 0022-2836 (Print) Journal Article.
- [96] S. J. McKessar, A. M. Berry, J. M. Bell, J. D. Turnidge, and J. C. Paton. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(11):3224–8, 2000. 0066-4804 (Print) Journal Article.
- [97] K. T. Mieskes, S. Rusch-Gerdes, C. Truffot-Pernot, K. Feldmann, E. Tortoli, M. Casal, T. Loscher, and H. Rinder. Rapid, simple, and culture-independent detection of *rpsL* codon 43 mutations that are highly predictive of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Trop Med Hyg*, 63(1-2):56–60, 2000. 0002-9637 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [98] G. H. Miller, F. J. Sabatelli, R. S. Hare, Y. Glupczynski, P. Mackey, D. Shlaes, K. Shimizu, and K. J. Shaw. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms—changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis*, 24 Suppl 1:S46–62, 1997. 1058-4838 (Print) Journal Article.
- [99] K. U. Mir and E. M. Southern. Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 17(8):788–92, 1999. 1087-0156 (Print) Journal Article.
- [100] D. Moazed, B. J. Van Stolk, S. Douthwaite, and H. F. Noller. Interconversion of active and inactive 30 S ribosomal subunits is accompanied by a conformational change in the decoding region of 16 S rRNA. *J Mol Biol*, 191(3):483–93, 1986. 0022-2836 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.



- [101] MolecularDevices. GenePixPro 6.0 Microarray Acquisition and analysis software for GenePix microarray scanners. . *User's guide Tutorial*, 2005.
- [102] G. Muyzer and K. Smalla. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73(1):127–41, 1998. 0003-6072 (Print) Journal Article Review.
- [103] J. Nair, D. A. Rouse, G. H. Bai, and S. L. Morris. The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 10(3):521–7, 1993. 0950-382X (Print) Journal Article.
- [104] U. Nübel, M. Antwerpen, B. Strommenger, and W. Witte. DNA microarrays for bacterial genotyping. In E. Stackebrandt, editor, *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes*, pages 287–313. Springer Verlag, Heidelberg, 2006.
- [105] U. Nübel, P. M. Schmidt, E. Reiss, F. Bier, W. Beyer, and D. Naumann. Oligonucleotide microarray for identification of *Bacillus anthracis* based on intergenic transcribed spacers in ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 240(2):215–23, 2004. 0378-1097 (Print) Journal Article.
- [106] U. Nübel, B. Strommenger, G. Werner, and W. Witte. Schnelle Diagnostik Bakterieller Infektionserreger. *Epidemiologisches Bulletin*, 6/2006:1–5, 2006.
- [107] W. L. Nicholson and H. Maughan. The spectrum of spontaneous rifampin resistance mutations in the *rpoB* gene of *Bacillus subtilis* 168 spores differs from that of vegetative cells and resembles that of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 184(17):4936–40, 2002. 0021-9193 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [108] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, M. Noyong, and U. Simon. Bifunctional DNA-gold nanoparticle conjugates as building blocks for the self-assembly of cross-linked particle layers. *Biochem Biophys Res Commun*, 311(4):995–9, 2003. 0006-291X (Print) Evaluation Studies Journal Article.
- [109] I. Noppe-Leclercq, F. Wallet, S. Haentjens, R. Courcol, and M. Simonet. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method

- for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol*, 150(5):317–22, 1999. 0923-2508 (Print) Journal Article.
- [110] T. Pastinen, M. Raitio, K. Lindroos, P. Tainola, L. Peltonen, and A. C. Syvanen. A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Res*, 10(7):1031–42, 2000. 1088-9051 (Print) Journal Article.
- [111] V. Perreten, L. Vorlet-Fawer, P. Slickers, R. Ehricht, P. Kuhnert, and J. Frey. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol*, 43(5):2291–302, 2005. 0095-1137 (Print) Journal Article.
- [112] R. D. Perry and J. D. Fetherston. *Yersinia pestis*—etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev*, 10(1):35–66, 1997. 0893-8512 Historical Article Journal Article Review Review, Academic.
- [113] M. Pirrung. Die Herstellung von DNA-Chips. *Angewandte Chemie*, 114:1326–1341, 2002.
- [114] A. P. Pomerantsev, N. A. Shishkova, and L. I. Marinin. [Comparison of therapeutic effects of antibiotics of the tetracycline group in the treatment of anthrax caused by a strain inheriting tet-gene of plasmid pBC16]. *Antibiot Khimioter*, 37(4):31–4, 1992. 0235-2990 (Print) Journal Article.
- [115] L. B. Price, A. Vogler, T. Pearson, J. D. Busch, J. M. Schupp, and P. Keim. In vitro selection and characterization of *Bacillus anthracis* mutants with high-level resistance to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(7):2362–5, 2003. 0066-4804 Journal Article.
- [116] Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin, 257. edition, 1993.
- [117] D. A. Rasko, M. R. Altherr, C. S. Han, and J. Ravel. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev*, 29(2):303–29, 2005. 0168-6445 (Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov’t, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov’t, P.H.S. Review.

- [118] D. A. Rasko, J. Ravel, O. A. Okstad, E. Helgason, R. Z. Cer, L. Jiang, K. A. Shores, D. E. Fouts, N. J. Tourasse, S. V. Angiuoli, J. Kolonay, W. C. Nelson, A. B. Kolsto, C. M. Fraser, and T. D. Read. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic Acids Res*, 32(3):977–88, 2004. 1362-4962 Journal Article.
- [119] D. A. Rasko, M. J. Rosovitz, O. A. Okstad, D. E. Fouts, L. Jiang, R. Cer, A. B. Kolsto, S. Gill, and J. Ravle. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus* group plasmids including *B. anthracis* pXO1. *J. Bacteriol.*, doi:10.1128/JB.01313-06, 2006.
- [120] T. D. Read, S. N. Peterson, N. Tourasse, L. W. Baillie, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, H. Tettelin, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, E. K. Holtzapple, O. A. Okstad, E. Helgason, J. Rilstone, M. Wu, J. F. Kolonay, M. J. Beanan, R. J. Dodson, L. M. Brinkac, M. Gwinn, R. T. DeBoy, R. Madpu, S. C. Daugherty, A. S. Durkin, D. H. Haft, W. C. Nelson, J. D. Peterson, M. Pop, H. M. Khouri, D. Radune, J. L. Benton, Y. Mahamoud, L. Jiang, I. R. Hance, J. F. Weidman, K. J. Berry, R. D. Plaut, A. M. Wolf, K. L. Watkins, W. C. Nierman, A. Hazen, R. Cline, C. Redmond, J. E. Thwaite, O. White, S. L. Salzberg, B. Thomason, A. M. Friedlander, T. M. Koehler, P. C. Hanna, A. B. Kolsto, and C. M. Fraser. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*, 423(6935):81–6, 2003. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- [121] Regierung der Bundesrepublik Deutschland. Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen, 1995.
- [122] S. Riedel. Anthrax: a continuing concern in the era of bioterrorism. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 18(3):234–243, 2005.
- [123] RKI. Empfehlung des Robert Koch-Institutes: Vorgehensweise bei Verdacht auf Kontamination mit gefährlichen Erregern (z. B. Verdacht auf bioterroristischen Anschlag). [www.rki.de](http://www.rki.de), 2002.
- [124] M. C. Roberts. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action,

- regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev*, 19(1):1–24, 1996. 0168-6445 (Print) Journal Article Review.
- [125] M. C. Roberts. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*, 245(2):195–203, 2005. 0378-1097 (Print) Journal Article Review.
- [126] R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, and H. A. Erlich. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(16):6230–4, 1989. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [127] J. Sambrook and D. W. Russel. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab, 2001.
- [128] J. Sanchez-Cespedes, M. M. Navia, R. Martinez, B. Orden, R. Millan, J. Ruiz, and J. Vila. Clonal dissemination of *Yersinia enterocolitica* strains with various susceptibilities to nalidixic acid. *J Clin Microbiol*, 41(4):1769–71, 2003. 0095-1137 (Print) Journal Article.
- [129] M. Schena. *Microarray Biochip Technology*. Eaton Publisher, Sunnyvale, CA, USA, 2000.
- [130] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235):467–70, 1995. 0036-8075 Journal Article.
- [131] S. Schwonbeck. *Analyse von Single Nucleotide Polymorphisms an Glas - Oberflächen*. PhD thesis, Universität Potsdam, 2004.
- [132] N. Sergeev, D. Volokhov, V. Chizhikov, and A. Rasooly. Simultaneous analysis of multiple staphylococcal enterotoxin genes by an oligonucleotide microarray assay. *J Clin Microbiol*, 42(5):2134–43, 2004. 0095-1137 (Print) Journal Article.
- [133] K. J. Shaw, R. S. Hare, F. J. Sabatelli, M. Rizzo, C. A. Cramer, L. Naples, S. Kocsi, H. Munayyer, P. Mann, G. H. Miller, and et al. Correlation between aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridization of clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 35(11):2253–61, 1991. 0066-4804 (Print) Journal Article.

- [134] K. J. Shaw, P. N. Rather, R. S. Hare, and G. H. Miller. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*, 57(1):138–63, 1993. 0146-0749 (Print) Journal Article Review.
- [135] W. Siegenthaler, W. Kaufmann, H. Hornbostel, and H. Waller. *Lehrbuch der Inneren Medizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. auflage edition, 1992.
- [136] E. Southern. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98:503–517, 1975.
- [137] E. Southern, K. Mir, and M. Shchepinov. Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet*, 21(1 Suppl):5–9, 1999. 1061-4036 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [138] E. M. Southern, U. Maskos, and J. K. Elder. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics*, 13(4):1008–17, 1992. 0888-7543 (Print) Journal Article.
- [139] R. Spencer and M. Wilcox. Agents of biological warfare. *Revue of Medical Microbiology*, 4:138–143, 1993.
- [140] R. L. Stears, T. Martinsky, and M. Schena. Trends in microarray analysis. *Nat Med*, 9(1):140–5, 2003. 1078-8956 (Print) Journal Article.
- [141] S. Stern, T. Powers, L. M. Changchien, and H. F. Noller. Interaction of ribosomal proteins S5, S6, S11, S12, S18 and S21 with 16 S rRNA. *J Mol Biol*, 201(4):683–95, 1988. 0022-2836 (Print) Journal Article.
- [142] C. D. Steward, D. Wallace, S. K. Hubert, R. Lawton, S. K. Fridkin, R. P. Gaynes, J. McGowan, J. E., and F. C. Tenover. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of project ICARE laboratories. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 38(1):59–67, 2000. 0732-8893 (Print) Journal Article Validation Studies.
- [143] B. Strommenger, C. Kettlitz, G. Werner, and W. Witte. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 41(9):4089–94, 2003. 0095-1137 (Print) Journal Article.

- [144] B. Strommenger, C. Schmidt, G. Werner, B. Roessle-Lorch, T. Bachmann, and W. Witte. DNA microarray for the detection of therapeutically relevant antibiotic resistance determinants in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Probes*, doi:10.1016/j.mcp.2006.10.003, 2006.
- [145] A. Sundsfjord, G. S. Simonsen, B. C. Haldorsen, H. Haaheim, S. O. Hjelmevoll, P. Littauer, and K. H. Dahl. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *Apmis*, 112(11-12):815–37, 2004. 0903-4641 (Print) Journal Article Review.
- [146] F. C. Tenover, K. L. Phillips, T. Gilbert, P. Lockhart, P. J. O’Hara, and J. J. Plorde. Development of a DNA probe from the deoxyribonucleotide sequence of a 3-N-aminoglycoside acetyltransferase [AAC(3)-I] resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 33(4):551–9, 1989. 0066-4804 (Print) Journal Article.
- [147] A. R. Timms, H. Steingrimsdottir, A. R. Lehmann, and B. A. Bridges. Mutant sequences in the *rpsL* gene of *Escherichia coli* B/r: mechanistic implications for spontaneous and ultraviolet light mutagenesis. *Mol Gen Genet*, 232(1):89–96, 1992. 0026-8925 (Print) Journal Article.
- [148] H. Tomaso, E. C. Reisinger, S. Al Dahouk, D. Frangoulidis, A. Rakin, O. Landt, and H. Neubauer. Rapid detection of *Yersinia pestis* with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 38(2):117–26, 2003. 0928-8244 Journal Article.
- [149] P. C. Turnbull, N. M. Sirianni, C. I. LeBron, M. N. Samaan, F. N. Sutton, A. E. Reyes, and J. Peruski, L. F. MICs of selected antibiotics for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus mycoides* from a range of clinical and environmental sources as determined by the Etest. *J Clin Microbiol*, 42(8):3626–34, 2004. 0095-1137 Journal Article.
- [150] H. Urakawa, S. El Fantroussi, H. Smidt, J. C. Smoot, E. H. Tribou, J. J. Kelly, P. A. Noble, and D. A. Stahl. Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol*, 69(5):2848–56, 2003. 0099-2240 Journal Article.
- [151] M. S. Urdea, B. D. Warner, J. A. Running, M. Stempien, J. Clyne, and T. Horn. A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods

- using fluorescent, chemiluminescent and enzyme labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*, 16(11):4937–56, 1988. 0305-1048 (Print) Journal Article.
- [152] S. B. Vakulenko and S. Mobashery. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev*, 16(3):430–50, 2003. 0893-8512 (Print) Journal Article Review.
- [153] T. C. Victor, A. M. Jordaan, A. van Rie, G. D. van der Spuy, M. Richardson, P. D. van Helden, and R. Warren. Detection of mutations in drug resistance genes of *Mycobacterium tuberculosis* by a dot-blot hybridization strategy. *Tuber Lung Dis*, 79(6):343–8, 1999. 0962-8479 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t.
- [154] A. J. Vogler, J. D. Busch, S. Percy-Fine, C. Tipton-Hunton, K. L. Smith, and P. Keim. Molecular analysis of rifampin resistance in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(2):511–3, 2002. 0066-4804 Journal Article.
- [155] D. Volokhov, V. Chizhikov, K. Chumakov, and A. Rasooly. Microarray analysis of erythromycin resistance determinants. *J Appl Microbiol*, 95(4):787–98, 2003. 1364-5072 (Print) Journal Article.
- [156] D. Volokhov, V. Chizhikov, K. Chumakov, and A. Rasooly. Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J Clin Microbiol*, 41(9):4071–80, 2003. 0095-1137 (Print) Journal Article.
- [157] D. Volokhov, A. Rasooly, K. Chumakov, and V. Chizhikov. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *J Clin Microbiol*, 40(12):4720–8, 2002. 0095-1137 (Print) Evaluation Studies Journal Article.
- [158] G. J. Vora, C. E. Meador, M. M. Bird, C. A. Bopp, J. D. Andreadis, and D. A. Stenger. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52):19109–14, 2005. 0027-8424 (Print) Journal Article.

- [159] M. M. Wade, D. Volokhov, M. Peredelchuk, V. Chizhikov, and Y. Zhang. Accurate mapping of mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a scanning-frame oligonucleotide microarray. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 49(2):89–97, 2004. 0732-8893 (Print) Journal Article.
- [160] C. X. Wang, P. Q. Cai, Y. Guo, Z. M. Huang, and Z. H. Mi. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnrA* gene in *Enterobacter cloacae* clinical isolates in China. *J Hosp Infect*, 63(3):349–50, 2006. 0195-6701 (Print) Letter.
- [161] M. Wang, D. F. Sahm, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(4):1295–9, 2004. 0066-4804 (Print) Journal Article.
- [162] M. Wang, J. H. Tran, G. A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang, and D. C. Hooper. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(7):2242–8, 2003. 0066-4804 (Print) Journal Article.
- [163] G. Werner, R. J. Willems, B. Hildebrandt, I. Klare, and W. Witte. Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, 41(4):1499–506, 2003. 0095-1137 Evaluation Studies Journal Article.
- [164] M. Whitby, T. A. Ruff, A. C. Street, and F. J. Fenner. Biological agents as weapons 2: anthrax and plague. *Med J Aust*, 176(12):605–8, 2002. 0025-729X (Print) Journal Article Review.
- [165] P. A. White, C. J. McIver, Y. Deng, and W. D. Rawlinson. Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*. *FEMS Microbiol Lett*, 182(2):265–9, 2000. 0378-1097 Journal Article.
- [166] P. A. White, C. J. McIver, and W. D. Rawlinson. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(9):2658–61, 2001. 0066-4804 Journal Article.
- [167] X. Yu. *Entwicklung eines Diagnostischen DNA-Microarrays zur Genotypisierung der Chinolone Resistenz von Escherichia coli*. PhD thesis, Universität Stuttgart, 2004.



- [168] X. Yu, M. Susa, C. Knabbe, R. D. Schmid, and T. T. Bachmann. Development and validation of a diagnostic DNA microarray to detect quinolone-resistant *Escherichia coli* among clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 42(9):4083–91, 2004. 0095-1137 Journal Article.
- [169] J. Yue, W. Shi, J. Xie, Y. Li, E. Zeng, L. Liang, and H. Wang. Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a specialized oligonucleotide microarray. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 48(1):47–54, 2004. 0732-8893 Journal Article.
- [170] D. Zhou, Y. Han, Y. Song, Z. Tong, J. Wang, Z. Guo, D. Pei, X. Pang, J. Zhai, M. Li, Z. Cui, B. Qi, L. Jin, R. Dai, Z. Du, J. Bao, X. Zhang, J. Yu, J. Wang, P. Huang, and R. Yang. DNA Microarray Analysis of Genome Dynamics in *Yersinia pestis*: Insights into Bacterial Genome Microevolution and Niche Adaptation. *J Bacteriol*, 186(15):5138–46, 2004.
- [171] J. Zhou. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr Opin Microbiol*, 6(3):288–94, 2003. 1369-5274 Journal Article Review Review Literature.



# A Anhang

## A.1 Primer

Tab. A.1: Verwendete Primer Projekt „BaRes“

Name	Sequenz (5'-3')	Größe (nt)	PCR- Ansatz	Referenz
<b>Projekt BaRes</b>				
rpoB - F	CGT GAG AGA ATG TCG ATC C	300	1	[154]
rpoB - R	CGC GAA CGA AGA TAA TGA			[154]
gyrA - F	CAA CAA GCA CGA ATT CGA G	446	1	
gyrA - R	GAA CCA TCA TAG TTA TCT TG			
gyrB - F	CAG AGG CAT TTG AAA AGT TC	472	1	
gyrB - R	ACG TTA ATA ATA GGG TAC G			
tetMO - F	GTC MRT CTG AAC TWT GCG	589	1	
tetMO - R	AAT CCT TTC TGG GCT TC			
tetK - F	CAC CTA AAG CTA CAA TTG ATC	200	2	
tetK - R	TTG AGC TGT CTT GGT TCA			[163]
tetL - F	GCT GTA TAT GGA AAG CTA TC	235	2	
tetL - R	CCA TGG CTA CTA TCG ATC C			
vanAB - F	GTA GGC TGC GAT ATT CAA AGC		2	[143]
vanB - R	GCC GAC AAT CAA ATC ATC CTC	330		[143]
vanA - R	CTT CCT GAT GAA TAC GAA AG	370		
parC - F	GGA ATT TCT GTT GCA TAA CC	517	2	
parC - R	CTC CCG CTT GAA GAC GT			
parE - F	ACC AGC TTC GAT AAG TGG	478	-	
parE - R	TAG CTA CAC TTC TTG TGA GTT		-	
EU 341 - F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	566	-	[102]
EU 907 - R	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT		-	

Tab. A.2: Verwendete Primer Projekt „YpRes“

Name	Sequenz (5'-3')	Größe (nt)	PCR- Ansatz	Referenz
<b>Projekt YpRes</b>				
Yp- <i>gyrA</i> - F	ATG AGC GAC CTT GCG AGA G	628	1	
Yp- <i>gyrA</i> - R	TCA GCC CTT CAA TGC TGA TG			
tet - F	GGV ATH GGY YTK RTY ATG CCR	287	2	
tet - R	MGC VCC DGT VGC NCC DGT GAY			
aac3-Ia - F	GGC TCA AGT ATG GGC ATC AT	155	2	
aac3-Ia - R	ACG GAG CAA GTT CCC GAG GTA			
aac3-Iia - F	TCT GGA TCA ACG GAC CTT TC	203	2	
aac3-Iia - R	GAT CGT AAG TCC CCT CCA CA			
aac3-Iva - F	TTG ATG GCA AAG GTT CCC TA	164	2	
aac3-Iva - R	ACC GAC TGG ACC TTC CTT CT			
ant2-Iia - F	ACA ACG CAG GTC ACA TTG	210	2	
ant2-Iia - R	AGT CCA ACT CCT CCA TGA CG			
ant3-Ia - F	GCA GTC GCC CTA AAA CAA AG	191	2	
ant3-Ia - R	TCA CCG TAA CCA GCA AAT CA			
aph3-Ib - F	TGA CTG GTT GCC TCT CAG AG	216	2	
aph3-Ib - R	AAT TGC CGT TAT CAC CAA GC			
aph6-Id - F	GAC GAC CTT TGT CTC GAT CC	151	2	
aph6-Id - R	CGT TGC TCC TCT TCT CCA TC			
Yp-rpsL - F	CGC AGC ATG AAG GTT GC	300	-	
Yp-rpsL - R	GCT TCT TCA CGC CGT AC		-	

## A.2 Sonden

Tab. A.3: Verwendete Sonden Projekt „BaRes“. Alle Sonden wurden am 5'-Ende phosphoryliert. + Für jede Sequenzposition mit beobachteten Mutationen wurden vier Sonden entwickelt, die sich nur in einer Base in zentraler Position unterscheiden. Sonden beinhalten A, G, T oder C an der mit N gekennzeichneten Stelle.

Name	Sondenlage	Sequenz (5'-3') <sup>+</sup>	Ref.
Spkontr*Cy5		TGGGATCGCATCGTTAGG	
Negkontrolle		TGGGATCGCATGGTTAGG	
BWM 111		CATACAAATTGCGGAATTTAT	[105]
RC-BWM 111		ATAAATTCCGCAATTTGTATG	[105]
<b>Projekt BaRes</b>			
gyrA 1	<i>gyrA</i> C254T	CCCTCATCGTGATTNAGCTGTTTATG*	
gyrA 2	<i>gyrA</i> G264A	ACGCTGTTTATNAAACAATGGTA	
gyrA 3	<i>gyrA</i> A266C	ACGCTGTTTATGNAACAATGGTAC	
gyrB 1	<i>gyrB</i> G1309A	GTAGAGGGTNACTCTGCCGGT	
gyrB 2	<i>gyrB</i> A1423G	ATTTTATCTNACGATGAAGTG	
parC 1	<i>parC</i> C242T	CATGGTGATTNCTCTGTATA	
parC 2	<i>parC</i> G253A	CCTCTGTATATNRGGCGATGG	
rpoB 1	<i>rpoB</i> C1395T	TCGGAAGTTNTCAGTTATCT	
rpoB 2	<i>rpoB</i> C1401T	TTCTCAGTTATNTCAGTTCATGGA	
rpoB 3	<i>rpoB</i> A1404G	GTTATCTCNGTTCATGGAC	
rpoB 4	<i>rpoB</i> A1420T	ATGGACCAANCAAATCCGT	
rpoB 5	<i>rpoB</i> C1443T	CAGAGTTAACTNACAAACGAAGA	
rpoB 6	<i>rpoB</i> A1444G	CAGAGTTAACTCNCAAACGAAGA	
rpoB 7	<i>rpoB</i> A1448C	GAGTTAACTCACNAACGAAGATTA	
rpoB 8	<i>rpoB</i> C1459T	CGAAGATTATNTGCATTAGG	
tetK	<i>tet(K)</i>	ATGGTGGTTGTAGCTAGAA	
tetL-1	<i>tet(L)</i> conserved	GTTGCGCGCTATATTCCA	
tetL-2	<i>tet(L)</i> xsome	GTTGCAGTTGGAATAAGC	
tetL-3	<i>tet(L)</i> plasmid	TAAACCACCTGCGAGTAC	
tetM	<i>tet(M)</i>	ATTAGTGCACTGTTGCAAGA	
tetO	<i>tet(O)</i>	CTCCAAACAACGATTGCAG	

Fortsetzung nächste Seite ...

Name	Sondenlage	Sequenz (5'-3') <sup>+</sup>	Ref.
tetO/M	<i>tet(M/O)</i> conserved	AATCCTTTCTGGGCTTC	
vanA	<i>vanA</i>	AGCTCAGCAATTGTATGGA	
vanB	<i>vanB</i>	AAGCTCCGCAGCTTGCAT	
vanA/B	<i>vanA/B</i> conserved	CGGGCTGTGAGGTCGG	

Tab. A.4: Verwendete Sonden Projekt „YpRes“. Alle Sonden wurden am 5'-Ende phosphoryliert. <sup>+</sup> Für jede Sequenzposition mit beobachteten Mutationen wurden vier Sonden entwickelt, die sich nur in einer Base in zentraler Position unterscheiden. Sonden beinhalten A, G, T oder C an der mit N gekennzeichneten Stelle.

Name	Sondenlage	Sequenz (5'-3') <sup>+</sup>	Ref.
Spkontr*Cy5		TGGGATCGCATCGTTAGG	
Negkontrolle		TGGGATCGCATGGTTAGG	
BWM 111		CATACAAATTGCGGAATTTAT	[105]
RC-BWM 111		ATAAATTCCGCAATTTGTATG	[105]

#### Projekt YpRes

gyrA 1	<i>gyrA</i> G219 T	AAAAATCGNCCCGTGTAGT	
gyrA 2	<i>gyrA</i> G259 T	CCACCCGCATNGTGACAGCGCG	
gyrA 3	<i>gyrA</i> G260 A	CCACCCGCATGNTGACAGCGCG	
gyrA 4	<i>gyrA</i> G262 A	CCCGCATGGTNACAGCGCGGTCT	
gyrA 5	<i>gyrA</i> G266 T	CATGGTGACANCGCGGTCTAC	
gyrA 6	<i>gyrA</i> C267 G	CATGGTGACAGNCGCGGTCTAC	
gyrA 7	<i>gyrA</i> G268 C	CATGGTGACAGCNCGGTCTAC	
gyrA 8	<i>gyrA</i> G277 A	GCGGTCTACNACACTATCGTG	
gyrA 9	<i>gyrA</i> G335 C	TGGATGGGCANGGTAACCTT	
tet	<i>tet(A/B/C/D)</i>	GGCRTDYGCTDGCRCCTDTATGCG	
aac(3)-Ia	<i>aac(3)-Ia</i>	GCTCTTGATCTTTTCGGTCG	
aac(3)-Iia	<i>aac(3)-Iia</i>	ATGCTTACGTGAAGCTCGGT	
aac(3)-Iva	<i>aac(3)-Iva</i>	GGCTGAAGGAGAAGAGCCTT	
ant(2'')-Ia	<i>ant(2'')-Ia</i>	AAAATTCTAGCTGCGGCAGA	
ant(3'')-Ia	<i>ant(3'')-Ia</i>	GATATTGATTTGCTGGTTACGGTGA	
aph(3'')-Ib	<i>aph(3'')-Ib</i>	TTTCTTTTTTCGACGTGGTGA	
aph(6'')-Id	<i>aph(6'')-Id</i>	TACGCTTATGGGTGCCTTTC	

A.3 Spottinglayout „Bares“

	CIP							RIF							
	CIP7	CIP6	CIP5	CIP4	CIP3	CIP2	CIP1	RIF8	RIF7	RIF6	RIF5	RIF4	RIF3	RIF2	RIF1
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J					
1	SpKontrolle	vanA	parC253Gwt	parC242Awt	gyrB1423Awt	gyrB1309Gwt	gyrA266Awt	gyrA265Gwt	gyrA254Cwt	SpKontrolle					
2	tetM	vanB	A	T	G	A	C	A	T	Spkontrolle					
3	tetO	vanAB	C	A	C	C	T	C	G	neg Hyb					
4	tetOM	tetK	T	G	T	T	G	T	A	pos Hyb					
5	tetL 1	rpoB1459Cwt	rpoB1448Awt	rpoB1444Awt	rpoB1443Cwt	rpoB1420Awt	rpoB1404Awt	rpoB1401Cwt	rpoB1395Cwt	neg Hyb					
6	tetL2	T	C	G	T	T	G	G	G	pos Hyb					
7	tetL3	G	T	T	G	G	T	T	A	neg Hyb					
8	SpKontrolle	A	G	C	A	C	C	A	T	SpKontrolle					

Abb. A.1: Spottingplan. Derselbe Block wurde viermal gespottet um Quadruplikate zu erhalten

## A.4 Spottinglayout „YpRes“

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
1	gyrA 219	gyrA 259	gyrA 260	gyrA 262	gyrA 266	gyrA 267	gyrA 268	gyrA 277	gyrA 335	G	tet(ABCD)	ant2-IIa	pos
2	G	G	G	G	G	C	C	A	C	C	ant3-Ia	aac3-Ia	Puffer
3	A	T	A	T	A	A	T	T	T	T	aph3-Ib	aac3-IIa	Puffer
4	C	A	C	C	C	T	A	C	A	A	aph6-Ia	aac3-IVa	pos

Abb. A.2: Spottingplan. Derselbe Block wurde sechsmal gespottet um Hexa-Replikate zu erhalten



A.5 Ergebnisse Blind-Studie

Nr	Ergebnis Multiplex	DNA-Microarray "Ypres"						Phenotypie „NRZ-Salmonellen und andere Enteritiserreger“			
		Slide – Nr.	gyrA CIP/NAL*	aac3-Ia aac3-IIa aac3-IVa	an2-Ia an3-Ia	strA strB STR*	OTe*	Stammbezeichnung CIP/	NAL* GEN*	STR* OTE*	Sonstiges*
MA-		A146hyb1						06-07709		X	AMP, SMZ
		A147hyb1						06-07082			AMP
		A145hyb1	267 G		X			06-07081	X	X	AMP, CMP, SMZ
		A148hyb1						06-06972			AMP
		A149hyb1	277 T		X			06-06777	X	X	AMP, CMP, SMZ
		A150hyb1			X			06-06749		X	AMP, CMP, CTM, MEZ, SMZ, SXT
		A152hyb1						06-06733			AMP, SMZ
		A151hyb1			X			06-06720		X	AMP, SXT
		A155hyb1						06-06617			AMP, CMP, COX, SMZ
		A163hyb1						06-06616			AMP, CMP, CTM, SMZ
11		A152hyb1			X			06-05811		X	AMP, SMZ
12		A154hyb1			X			06-05678		X	AMP, CMP, CTM, MEZ, SMZ, SXT
13		A146hyb2						06-05677			AMP, CMP, CTM, MEZ, SMZ
14		A147hyb2						06-05099			AMP
15		A156hyb1				X	X	06-04957		X	AMP, COX, KAN
16		A149hyb2						06-04862			AMP, CMP, COX, CTM, SMZ
17		A145hyb2	X					06-04778	X		AMP, MEZ, SMZ
18		A150hyb2						06-04392			AMP, COX, SMZ
19		A151hyb2						06-03972			AMP, COX, SMZ
20		A148hyb2					X	06-03722			AMP, CMP, MEZ, SMZ

Abb. A.3: Detaillierte Ergebnisse der Blind Studie. Ergebnisse der Multiplex-PCR, der Microarray-Auswertung und der phenotypischen Resistenztestung aufgeschlüsselt nach Untersuchungsstamm (Fortsetzung nächste Seite)

Nr	DNA-Microarray "Ypres"						Phenotypie „NRZ-Salmonellen und andere Enteritiserreger“			
	Ergebnis Multiplex	Slide – Nr.	gyrA	aac3-Ia aac3-IIa aac3-IVa	an2-Ia an2-IIa	an3-Ia	STR*	STR	CIP/NAL* GEN*	Sonstiges*
MA-										
21		A152hyb2								AMP, COX
22		A158hyb1					X	X		AMP
23		A153hyb2								AMP
24		A154hyb2								AMP, COX
25		A157hyb2								AMP, COX
26		A164hyb1	266 T						X	AMP
27		A157hyb1					X	X		AMP, COX, SMZ
28		A159hyb1					X	X		AMP, COX, SMZ
29		A158hyb2								AMP, COX, CTM, MEZ, SMZ
30		A161hyb1				X			X	
31		A159hyb2								AMK, AMP, CMP, CTM, MEZ, SMZ
32		A163hyb2								AMP, SMZ
33		A155hyb2				X			X	AMP, SMZ
34		A161hyb2								AMP, CMP, COX, CTM, MEZ, SMZ
35		A156hyb2				X			X	AMP, STR
36		A162hyb1	?						X	
37		A164hyb2								AMP, STM, MEZ, SMZ
38		A160hyb1				X	X	X		AMP, CTM, KAN, MEZ, SMZ, SXT
39		A162hyb2								AMP, CAZ, CTM, MEZ, MSU, SMZ
40		A160hyb2								AMP, COX, SMZ

AMK Amikazin, AMP Ampicillin, CAZ Cefazolin, CIP Ciprofloxacin, CTM Cefotiam, COX Cefoxitin, GEN Gentamicin, KAN Kanamycin, MEZ Mezlocillin, MSU Mezlocillin/Sulbactam, NAL Nalidixin, OTE Oxytetracyclin, SMZ Sulfamerazin, STR Streptomycin, SXT Sulfamerazin/Trimethoprim.

Abb. A.4: (Fortsetzung) Detaillierte Ergebnisse der Blind Studie. Ergebnisse der Multiplex-PCR, der Microarray-Auswertung und der phenotypischen Resistenztestung aufgeschlüsselt nach Untersuchungsstamm

## B Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aida	Advanced Image Data Analyzer
amol, fmol, nmol	attomol, femtomol, nanomol
Amp	Ampicillin
Array	räumlich begrenzte Anordnung von festphasengekoppelten Sonden auf einer Oberfläche
AS	Aminosäure
„BaRes“	Bacillus anthracis Resistenzchip (Teil-Projektnamen)
BLAST	Basic Lokal Alignment Search Tool, Ähnlichkeits-Suchprogramm
bp, Kbp, Mbp	Basenpaare, Kilobasenpaare, Megabasenpaare
BSA	Rinder-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	double stranded DNA, Doppelstrang-DNA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol

evtl.	eventuell
g	Gramm
x g	x-fache der Erdbeschleunigung
h	Stunden
l	Liter
m	Meter
M	Molar (mol/Liter)
m-	milli- ( $1 \times 10^{-3}$ )
$\mu$ -	mikro- ( $1 \times 10^{-6}$ )
Mikroarray	Miniaturanordnung festphasengekoppelter (hier) DNA-Sonden
min	Minuten
Mismatch	Gegenteil von Perfect Match, nicht perfekte Se- quenzübereinstimmung
MM	Mismatch
n-	nano- ( $1 \times 10^{-9}$ )
N-terminal	aminoterminal
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
Perfect Match	Gegenteil von Mismatch, perfekte Sequenzüberein- stimmung
pH	pH-Wert
PM	Perfect Match
Query	Treffer, die bei der Sequenzähnlichkeitssuche mit- tels BLAST-Analyse gefundene und ähnlichste Da- tenbanksequenz
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrium-Duodecylsulfat
S.O.B.	Super.Optimal.Broth
S.O.C.	S.O.B.-Medium with Catabolite Repression
SSC	Standard-Salzlösung-Citrat
ssDNA	single stranded DNA, Einzelstrang-DNA

---

Subject	Abfrage-Sequenz; mit der die BLAST-Analyse durchgeführt wird
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-Na <sub>2</sub> EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TE	Tris-Na <sub>2</sub> EDTA
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TRIS	Tris-(hydroxyl)-Aminomethan
ÜN	über Nacht
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u. a.	unter anderen
rpm	( <i>rounds per minute</i> Umdrehungen pro Minute )
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
„YpRes“	<i>Yersinia pestis</i> Resistenzchip (Teil-Projektname)
z. B.	zum Beispiel
Ω	Ohm



## C Danksagung

Herrn Prof. Dr. Witte danke ich für das entgegengebrachte Interesse an meiner Arbeit und der Möglichkeit in seiner Abteilung am Robert Koch-Institut diese Arbeit anzufertigen. Neben seinem enormen Fachwissen haben seine amüsanten Geschichten aus seinem unendlich scheinenden Repertoire meinen Vorstellungen über die wissenschaftliche Landschaft in Deutschland so manche bunte Note verliehen.

Frau Prof. Dr. Dersch möchte ich für ihr Entgegenkommen danken. Ohne sie wäre diese Arbeit an der TU Braunschweig nicht möglich geworden.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Jahn für die Übernahme des Vorsitzes des Prüfungskommission.

Herrn Dr. Ulrich Nübel danke ich besonders für seine Betreuung und die zahlreichen nützlichen Diskussionen. Gerade seine positiv gemeinten, manchmal aber auch kritischen Argumente waren es, die es mir ermöglichten, strukturiert und gezielt Probleme anzugehen und Lösungen zu finden.

Mein Dank gilt auch den übrigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Robert Koch-Instituts in Wernigerode für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft, stete Diskussionen und Aufmunterungen sowie das angenehme Arbeitsklima.

Frau Annette Weller kommt dabei für die mühselige Arbeit des Spottens des Projektes „YpRes“ ein ganz gesonderter Dank zu, ebenso den Kooperationspartnern des Projektes „BaRes“ am Fraunhofer IBMT.

Auch bei unseren IT-Spezialisten Herrn Dr. Michael Voigt und Andreas Tille möchte ich mich bedanken. Bei meinen kleinen und großen „Extrawünschen“ konnten sie fast immer kurzfristig eine Lösung bereitstellen. Ausserdem Dr. Andreas Nitsche und dem Sequenzierlabor am RKI in Berlin rund um Jule Tesch und Ute Buwitt, die ebenfalls am Gelingen der schönen Sequenzen beteiligt waren.

Den Spendern von DNA und Bakterienstämmen danke ich ebenso, denn ohne sie hätten die Microarrays nicht evaluiert werden können: Dr. Klee, Prof. Appel, Dr. Tietze, Prof. Tschäpe, Prof. Piepersberg und Prof. Schwarz.

Besonders herzlich möchte ich mich bei allen meinen Freunden bedanken, die mich

selbst auf große Entfernung hin während meiner Promotion moralisch unterstützt und ermutigt haben. Besonderer Dank gilt meinen beiden Lektoren Heike und Malte, die sich als Nicht-Microarray-Menschen bei der Korrektur tapfer durchgekämpft haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meinen Eltern. Ohne ihre ständige Bereitschaft mir in jeglicher Form zur Seite zu stehen, wäre es mir sicherlich nicht möglich gewesen, diese Arbeit in dieser kurzen Zeit anzufertigen.



# D Lebenslauf

Markus Heinrich Antwerpen

\* 03.April 1979

in Bad Neuenahr - Ahrweiler

Staatsangehörigkeit:Deutsch

08 / 89 - Schulbesuch und

06 / 98 **Abitur** am Vinzenz - Pallotti - Kolleg, Rheinbach

dabei

09 / 95 - **Auslandsaufenthalt** in Frankreich mit Schulbesuch

02 / 96 priv. Lycée St. Joseph, Avignon, Vaucluse, Frankreich

09 / 98 - **Bundeswehr**: Flex-Wehrdienst in der

08 / 99 Luftlandepionierkompanie 260, Saarlouis

10 / 99 - **Biologie (Diplom)** an der Rheinischen Friedrich

01 / 04 Wilhelms Universität Bonn, Schwerpunkt: Mikrobiologie, Diplomarbeit: „DNA Microarray zur Schnell Diagnostik von Yersinia pestis“ am Robert Koch - Institut, Berlin, Abteilung für Strukturelle Bioanalytik

dabei

02 / 02 - **Praktikum** DSMZ (Deutsche Sammlung für  
03 / 02 Mikroorganismen und Zellkulturen)

02 / 04 - **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** am Robert Koch - Institut,  
04 / 04 Berlin, Abteilung für Strukturelle Bioanalytik

seit

05 / 04 **Promotion** als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Robert Koch -  
Institut, Bereich Wernigerode, Abteilung für Nosokomiale Infektio-  
nen

### Stipendien und Auszeichnungen

Stipendium Doktoranden-Stipendium der Nachwuchsförderung des Robert-  
Koch-Instituts. (2004) Thema: DNA-Microarrays zur Detektion von  
Antibiotikaresistenzen in hochpathogenen Bakterien

Posterpreis Poster PC010: DNA microarray for detection of virulence genes  
from *Yersinia* spp. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine  
und Angewandte Mikrobiologie (2004), Bereich: Klinische Krank-  
heitserreger

### Publikationen

**Antwerpen, M.** (2004): DNA-Microarray zur Schnelldiagnostik von *Yersinia pestis*. Diplomarbeit, Universität Bonn, Fachbereich Biologie

**Nübel, U., M. Antwerpen, P. M. Schmidt, E. Reiß, F. Bier and D. Naumann** (2004): DNA microarrays for identification of highly pathogenic bacteria. Vortrag auf dem Statusseminar Chiptechnologien der Dechema, Frankfurt, 26.-27.1.2004.

---

**Antwerpen, M., B. Appel, D. Naumann and U. Nübel** (2004): DNA microarray for detection of virulence genes from *Yersinia* spp. Poster PC010 auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Braunschweig, 29.-31.3.2004. Biospektrum Sonderausgabe 2004: 104.

**Antwerpen, M., B. Appel, D. Naumann und U. Nübel** (2003): DNA-Microarray zur Schnelldiagnostik von *Yersinia pestis*. Poster auf RKI-Doktorandentagung, Berlin, 13.9.2003